



**FRANCISCO JOSÉ
BANDEIRA ANTÃO**

**FRACIONAMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO RESÍDUO DA DESTILAÇÃO VÍNICA**

**DOCUMENTO
PROVISÓRIO**



**FRANCISCO JOSÉ
BANDEIRA ANTÃO**

**FRACIONAMENTO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO
RESÍDUO DA DESTILAÇÃO VÍNICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Especialização em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e filha.

o júri

presidente

Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Isabel Ramos Novo Amorim de Barros
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

agradecimentos

Os meus agradecimentos são dirigidos de maneira especial ao Doutor Manuel António Coimbra e à Doutora Sílvia Rocha, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela proposta do tema de investigação, pela orientação científica, pela confiança em mim depositada para a sua concretização e pelo entusiasmo e amizade que sempre me dispensaram.

Agradeço à Prof^a. Maria Helena Rocha Leão, da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela preparação das microcápsulas.

Encontro-me especialmente reconhecido a todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Química Alimentar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelos momentos de trabalho, ajuda, conhecimentos transmitidos e amizade que partilhámos.

Por fim, dirijo uma palavra de reconhecimento a todos os colegas e restantes elementos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, de quem sempre recebi apoio e amizade.

palavras-chave

Vinho, destilação a pressão reduzida, compostos fenólicos, polissacarídeos, atividade antioxidante, microencapsulamento.

resumo

A destilação vínica surge como uma alternativa para o excesso de vinho produzido em virtude do destilado ser um produto de valor acrescentado. Usualmente não é dado nenhum préstimo ao resíduo obtido por destilação, apesar do seu elevado conteúdo em compostos bioativos. A família de compostos à qual são atribuídos a maioria dos benefícios associados ao vinho é a dos compostos fenólicos.

Neste trabalho, os compostos presentes no resíduo da destilação vínica foram separados em diferentes frações. As frações obtidas por precipitação em soluções aquosas a 50 e 70% de etanol (EtOH50 e EtOH70) são ricas em polissacarídeos com atividade antioxidante, com potencial utilização como fibra alimentar ($2,1 \text{ gL}^{-1}$ vinho). Do material solúvel na solução aquosa com 70% de etanol é possível obter frações de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante ($4,2 \text{ gL}^{-1}$ vinho).

A atividade antioxidante destes compostos pode ser preservada por microencapsulamento. Ao fim de 17 meses, os compostos microencapsulados apresentam uma atividade antioxidante muito superior aos compostos não microencapsulados, mesmo se armazenados na ausência de luz e humidade.

Este trabalho mostra que é possível obter a partir do resíduo da destilação vínica duas frações com potencial aplicação na elaboração de alimentos funcionais: uma fração rica em polissacarídeos e outra em compostos fenólicos. Ambas apresentam atividade antioxidante.

keywords

Distillation under reduced pressure, phenolic compounds, polysaccharides, antioxidant activity, microencapsulation.

abstract

The wine distillation is an alternative for the excess of wine produced because the wine spirit is a product with added value. Usually no value is given to the residue resultant from this process despite the high content of bioactive compounds. The phenolic compounds are a group of compounds to which has been attributed the majority of the benefits associated to the wine.

In this work, the compounds present in the residue were separated in different fractions. The fractions obtained by ethanol precipitation at 50 and 70% (EtOH50 and EtOH70) are rich in polysaccharides presenting antioxidant activity, and have the potential to be used as dietary fiber (2,1 gL⁻¹ wine). The fraction soluble in 70% ethanol contains compounds with high antioxidant activity (4,2 gL⁻¹ wine).

The antioxidant activity of these compounds can be preserved by microencapsulation. After 17 months, the microencapsulated compounds presented higher activity than the non microencapsulated compounds, even when stored in the absence of light and moisture.

This work shows that it is possible to recover from the wine distillation residue two fractions with potential application in the preparation of functional foods: a fraction rich in polysaccharides and a fraction rich in phenolic compounds, both presenting antioxidant activity.

ÍNDICE

1.	ENQUADRAMENTO DO TRABALHO.....	1
2.	INTRODUÇÃO	5
2.1.	COMPOSTOS FENÓLICOS	7
2.1.1.	Compostos fenólicos do vinho	9
2.1.1.1.	Ácidos fenólicos	10
2.1.1.2.	Flavonóides.....	12
2.1.1.3.	Antocianinas ou Antocianas	16
2.1.1.4.	Taninos	19
2.1.1.5.	Estilbenos	23
2.1.2.	Propriedades químicas, físicas e biológicas	24
2.2.	ANTIOXIDANTES	27
2.2.1.	O método de DPPH*	32
2.3.	POLISSACARÍDEOS	36
2.4.	MICROENCAPSULAMENTO	37
3.	OBJETIVOS DO TRABALHO.....	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1.	AMOSTRAS	49
4.2.	DESTILAÇÃO E FRACIONAMENTO DO VINHO TINTO.....	49
4.3.	ESTUDO DA ESTABILIDADE DAS FRAÇÕES AO ARMAZENAMENTO E MICROENCAPSULAMENTO	53
4.4.	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	53
4.5.	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES NEUTROS E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS URÓNICOS	54
4.5.1.	Hidrólise do material celular.....	54
4.5.2.	Análise de açúcares neutros.....	55
4.5.3.	Quantificação de ácidos urónicos	56
4.5.4.	Padrões.....	57
4.6.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	58

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1.	DESTILAÇÃO E FRACIONAMENTO DO VINHO TINTO.....	63
5.2.	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	64
5.3.	POLISSACARÍDEOS (AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS URÓNICOS)	68
5.4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	69
5.4.1.	Padrão: ácido gálico	71
5.4.2.	Frações ao fim de 7 (FL1) e 17 meses (FL2) de armazenamento.....	76
5.4.3.	Frações microencapsuladas e analisadas ao fim de 17 meses de armazenamento (FLM)	83
6.	CONCLUSÕES	89
7.	BIBLIOGRAFIA.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura química do fenol	8
Figura 2.2 - Estrutura química de ácidos hidroxibenzóicos (adaptado de Naczk e Shahidi, 2004)	11
Figura 2.3 - Estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos (adaptado de Naczk e She Shahidi, 2004).....	11
Figura 2.4 - Estrutura química base dos flavonóides (adaptado de Hertog <i>et al.</i> , 1992).....	13
Figura 2.5 - Estrutura química base dos flavonóis (adaptado de Hertog <i>et al.</i> , 1992).....	14
Figura 2.6 - Estrutura química base das flavonas (adaptado de Hertog <i>et al.</i> , 1992).	15
Figura 2.7 - Estrutura química base das flavanonas (adaptado de Merken e Beecher, 2000).....	15
Figura 2.8 - Estrutura química base dos 2,3-di-hidroflavonóis (adaptado de Pietta, 2000).	16
Figura 2.9 - Estrutura química da estilbina, um 2,3-di-hidroflavonol (adaptado de Landrault <i>et al.</i> , 2002).....	16
Figura 2.10 - Estrutura química da engeletina, um 2,3-di-hidroflavonol (adaptado de Lu e Foo, 1999).....	16
Figura 2.11 - Estrutura química do catião flavílio (adaptado de Pietta, 2000).....	17
Figura 2.12 - Estruturas químicas das antocianidinas mais abundantes no vinho (adaptado de Merken e Beecher, 2000).	18
Figura 2.13 - Estrutura das antocianinas glucosiladas (Cabrita <i>et al.</i> , 1999).....	18
Figura 2.14 - Estrutura química de um tanino hidrolisável (adaptado de Naczk e Shahidi, 2004).....	20
Figura 2.15 - Estrutura química do núcleo 3-hidroxi-flavano (adaptado de Sun e Spranger, 2005).....	20
Figura 2.16 - Unidades monoméricas das principais proantocianidinas (adaptado de Sun e Spranger, 2005).	21
Figura 2.17 - Estrutura química das proantocianidinas (adaptado de Sun e Spranger, 2005).....	22
Figura 2.18 - Estruturas químicas de estilbenos monómeros identificados no género <i>Vitis</i> :.....	23
Figura 2.19 - Mecanismo da atividade antioxidante (adaptado de Papas, 1999)	28
Figura 2.20 - Radical livre de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (adaptado de Molyneux, 2004).	33
Figura 2.21 - Forma não radicalar 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (adaptado de Molyneux, 2004).....	33
Figura 4.1 - Fluxograma do fracionamento do resíduo desalcoholizado resultante da destilação vínica.....	52
Figura 5.1 - Curva de calibração para o DPPH [•]	70
Figura 5.2 - Curvas de reação entre o DPPH [•] e as diferentes soluções de padrão.	72
Figura 5.3 - Gráfico da variação de %DPPH _{restante} em função da concentração de ácido gálico, que permitem o cálculo do valor EC ₅₀ do padrão em relação ao radical livre DPPH [•]	74
Figura 5.4 - Tempo necessário para se atingir o EC ₅₀ para diferentes concentrações de DPPH, que permite o cálculo do valor T _{EC50} do padrão.....	75
Figura 5.5 - Curvas de reação entre DPPH [•] e diferentes soluções da fração AcO 2 - FL1.	78

Figura 5.6 - Curvas de reação entre DPPH [•] e diferentes soluções da fração AcO 2 – FL2.....	78
Figura 5.7 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 – FL1, que permite o cálculo do valor EC ₅₀ da fração AcO 2 - FL1.....	79
Figura 5.8 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 – FL2, que permite o cálculo do valor EC ₅₀ da fração AcO 2 – FL2.....	80
Figura 5.9 - Tempo necessário para se atingir o EC ₅₀ para diferentes concentrações da fração AcO 2 - FL1, que permite o cálculo do valor T _{EC50} da fração AcO 2 - FL1.	81
Figura 5.10 - Tempo necessário para se atingir o EC ₅₀ para diferentes concentrações da fração AcO 2 – FL2, que permite o cálculo do valor T _{EC50} da fração AcO 2 – FL2.....	81
Figura 5.11 - Curvas de reação entre DPPH [•] e diferentes soluções da fração AcO 2 – FLM.....	84
Figura 5.12 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 – FLM, que permite o cálculo do valor EC ₅₀ da fração AcO 2 – FLM.....	85
Figura 5.13 - Tempo necessário para se atingir o EC ₅₀ para diferentes concentrações da fração AcO 2 – FLM, que permite o cálculo do valor T _{EC50} da fração AcO 2 - FLM.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Concentração dos compostos fenólicos maioritários em vinhos tinto e branco (adaptado de Frankel <i>et al.</i> , 1995).	9
Tabela 5.1 – Teor total das frações liofilizadas resultantes do resíduo desalcoholizado após a destilação de 10 L de vinho tinto.....	64
Tabela 5.2 – Resultados extraídos das curvas de calibração do ácido gálico e da (+)-catequina. .	65
Tabela 5.3 – Rendimento e quantificação em compostos fenólicos totais (CFT) para as diferentes frações, valores expressos como médias (CV), (n = 3).....	66
Tabela 5.4 – Valores publicados de compostos fenólicos totais para o vinho, usando o método de Folin-Ciocalteu.	67
Tabela 5.5 – Rendimento e composição em açúcares das frações liofilizadas (FL1) de polissacarídeos do resíduo desalcoholizado, valores expressos como médias (CV), (n = 6).	69
Tabela 5.6 - DPPH* _{rest} no estado de equilíbrio para as diferentes concentrações do padrão.	73
Tabela 5.7 - Intervalos das concentrações das frações (FL1 e FL2) preparadas, expressas em gL ⁻¹ vinho.	77
Tabela 5.8 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH* das frações FL1 e FL2 e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).....	83
Tabela 5.9 - Intervalos das concentrações das frações (FLM) preparadas, expressas em gL ⁻¹ vinho.	84
Tabela 5.10 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH* da fração FLM e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).....	87
Tabela 6.1 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH* das frações e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).....	91

ABREVIATURAS

A₇₆₅	absorvância a 765 nm
AcO	fração que contém material insolúvel em acetona
AcO 2	fração que contém material insolúvel em acetona (segunda aplicação)
AcOH	ácido acético
AE	eficiência antirradicalar
Ara	arabinose
CFT	compostos fenólicos totais
Cv	coeficiente de variação
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
DPPH[•]	radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DPPH[•]rest	DPPH [•] restante
EAG	equivalentes de ácido gálico
EC	equivalentes de (+)-catequina
EC₅₀	concentração para diminuir a concentração do radical livre em 50%
EtOAc	fração que contém material insolúvel em acetato de etilo
EtOH	fração que contém material insolúvel em etanol (segunda aplicação)
EtOH50	fração que contém material insolúvel em 50% de etanol
EtOH70	fração que contém material insolúvel em 70% de etanol
FL1	fração liofilizada com 7 meses de tempo de prateleira
FL2	fração liofilizada com 17 meses de tempo de prateleira
FLM	fração liofilizada microemcapsulada com 17 meses de tempo de prateleira
Fuc	fucose
Gal	galactose
GalA	ácido galacturónico
GC-FID	cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
Glc	glucose
AHB	ácido hidroxibenzóico
AHC	ácido hidroxicinâmico
UA	ácido urónico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
M	massa
Man	manose
R1	fração resíduo insolúvel a frio
Rha	ramnose
rpm	rotações por minuto
SnAcO	fração que contém material solúvel em acetona
T_{EC50}	tempo para diminuir a concentração do radical livre em 50%
v	volume
Xyl	xilose

1. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

A atividade vinícola tem uma grande relevância para a economia portuguesa. De acordo com o Eurostat – Yearbook 2010, Portugal possui uma área total de 210000 ha de vinha para produção de vinho. A produção total de vinho, média das últimas cinco campanhas (2005-2010) é cerca de 6800000 hL/ano. Portugal representa o quinto produtor a nível da União Europeia e ocupa o décimo segundo lugar a nível mundial no mesmo período de tempo (<http://ec.europa.eu/eurostat>, 2012).

A destilação vínica surge como uma alternativa para o excesso de vinho produzido em virtude do destilado ser um produto de valor acrescentado. A destilação gera resíduos para os quais não há uma utilização racional, apesar do seu elevado conteúdo em compostos bioativos (Pavlenko, 2000).

Em virtude do destilado ser um produto de valor acrescentado e de existirem ajudas comunitárias à destilação de vinhos, este surge como uma alternativa imediata face ao aumento de produção ou à existência de vinhos de baixa qualidade. O total de vinho destilado em Portugal desde as campanhas de 2001/2002 até 2006/2007 é respectivamente de 1406000, 1287000, 777000, 757000, 922000 e 900000 hL/ano (<http://ec.europa.eu/eurostat>, 2007). A destilação destes volumes gerou algumas toneladas de resíduos.

A destilação de vinho é o processo utilizado para a produção de aguardente vínica. É também uma alternativa para o excesso de produção de vinho. Do processo de destilação resulta um resíduo líquido desalcoholizado, que representa cerca de 85% do total de vinho, ao qual não é dado nenhum prémio, sendo descartado directamente como efluente, aumentando a carga de material orgânico no meio ambiente. No entanto, neste resíduo estão presentes os compostos fenólicos e polissacarídeos, com as características bioactivas do vinho, ou modificadas pela temperatura de 80-85°C e acidez elevada a que decorre a destilação vínica.

A recuperação de compostos antioxidantes a partir dos desperdícios contínuos da indústria de vinho poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente, visto que nessas indústrias vinícolas são produzidos grandes quantidades de resíduos que apresentam sérios problemas de armazenamento, de transformação, ou de eliminação, em termos

ecológicos e económicos. Esta situação, desde há algum tempo, explica o interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação (Alonso *et al.*, 2002).

2. INTRODUÇÃO

2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ocorrem naturalmente nos frutos, sementes, folhas e flores das plantas (Ho *et al.*, 1992; Katalinić *et al.*, 2004), sendo conhecidos mais de 8000 compostos fenólicos em plantas (Dreosti, 2000).

Esse grande e complexo grupo de compostos está presente em todos os seres vivos vegetais superiores (Landrault *et al.*, 2002), e em produtos industrializados feitos a partir destes como o vinho (Kova *et al.*, 1995; Lu e Foo, 1999) e são parte integrante da dieta humana (Katalinić *et al.*, 2004).

As frutas e os vegetais, além da sua composição nutritiva, apresentam moléculas como as vitaminas C e E, α -tocoferol, β -caroteno e compostos fenólicos, que protegem o organismo de várias doenças. Essas moléculas, que fazem parte dos constituintes da dieta humana, são potenciais antioxidantes naturais (Gaulejac *et al.*, 1999a). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com sua estrutura química (Rice-Enans *et al.*, 1995).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta às condições do stress como infeções, ferimentos e radiação UV (Naczki e Shahidi, 2004). Nas plantas, atuam como fungicidas, atratores de polinizadores, agentes de pigmentação, antioxidantes e agentes protetores contra a luz UV. Nos alimentos podem contribuir para as características organolépticas: amargor, adstringência, cor e aroma; e para a estabilidade oxidativa dos produtos (Naczki e Shahidi, 2004).

Os compostos fenólicos não estão uniformemente distribuídos nas plantas. Os insolúveis são componentes das paredes celulares, enquanto que os solúveis encontram-se nos vacúolos celulares (Naczki e Shahidi, 2004).

Os compostos fenólicos distribuem-se de modo desigual pelas diversas partes do fruto: grainhas, polpa, vasos fibrovasculares e película. Encontram-se nos vacúolos das células da polpa associados a polissacarídeos nos vasos fibrovasculares, e/ou livres no suco vascular das células da película. Nas películas também se podem encontrar associados a polissacarídeos das paredes celulares

e a proteínas constituintes das membranas dos vacúolos. Nas grainhas estão localizados nos tecidos mais externos, cutícula e epiderme (Cabrita *et al.*, 1999).

Os compostos fenólicos estão associados à qualidade sensorial e funcional da frescura e processamento dos vegetais. A reação de escurecimento enzimático catalisada pela polifenoloxidase é de importância vital no processamento de vegetais e frutos, devido a possíveis alterações à cor e aroma e perda de nutrientes. Por exemplo, a polifenoloxidase é a responsável pelo escurecimento das uvas (Ho *et al.*, 1992). Muitos compostos fenólicos das plantas são boas fontes de antioxidantes naturais, que inibem a auto-oxidação lipídica, e têm a capacidade de retardar a oxidação lipídica por inibição da atividade lipoxigenase (Ho *et al.*, 1992).

Os compostos fenólicos são uma família de compostos químicos, cuja estrutura comum é a presença de pelo menos um anel benzênico (C₆) ao qual se liga um ou mais grupos hidroxilo (-OH) (Cabrita *et al.*, 1999; Landrault *et al.*, 2002; Katalinić *et al.*, 2004).

A forma mais simples deste elemento estrutural é o fenol (**Figura 2.1**), que assim dá o nome a esta série de compostos. As uvas e os vinhos contêm uma série de compostos fenólicos, todos eles derivados desta estrutura básica, sendo que os teores totais de compostos fenólicos são maiores nas uvas do que nos vinhos (Cabrita *et al.*, 1999). A quantidade desses compostos, na uva, varia com a casta, com o clima e o solo (*terroir*) e com o grau de maturação da uva; no vinho, depende da tecnologia vitícola e da tecnologia enológica.

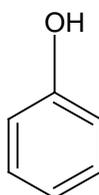


Figura 2.1 - Estrutura química do fenol

2.1.1. Compostos fenólicos do vinho

A quantidade de compostos fenólicos no vinho tinto é maior (1000-4000 mg/L) do que no vinho branco (200-300 mg/L) (Bravo, 1998). As uvas tintas contém em sua composição as antocianinas, moléculas responsáveis pela pigmentação (e portanto ausentes em uvas brancas). A diferença na quantidade de compostos fenólicos dos vinhos tintos e brancos não se deve apenas à presença das antocianinas, mas também aos processos de fabrico para obtenção do vinho. Na preparação de alguns vinhos tintos, as uvas são esmagadas com a película e grainha, gerando maior quantidade de compostos fenólicos no produto final (Frankel *et al.*, 1995).

Os compostos fenólicos maioritários dos vinhos tinto e branco encontram-se na **Tabela 2.1**.

Tabela 2.1 - Concentração dos compostos fenólicos maioritários em vinhos tinto e branco (adaptado de Frankel *et al.*, 1995).

Compostos fenólicos	Vinho Tinto (mg/L)	Vinho Branco (mg/L)
Catequina	191	35
Epigallocatequina	82	21
Ácido gálico	95	7
Cianidina	3	0
Malvidina-3-glicosideo	24	1
Rutina	9	0
Quercetina	8	0
Miricetina	9	0
Ácido cafeico	7,1	2,8
Resveratrol	1,5	0
Teores médios de compostos fenólicos totais *	2567	239

* Expresso em equivalente de ácido gálico e mg/L.

No vinho tinto a catequina e o ácido gálico são os compostos fenólicos em maior abundância. A catequina e a epigallocatequina são os compostos fenólicos majoritários do vinho branco, pois estão presentes em maior quantidade no extrato da película da uva branca. A predominância desses compostos pode sofrer alterações de acordo com a procedência e o tipo da uva (Jackson, 1994).

Uma das possíveis classificações dos polifenóis das uvas e dos vinhos é a sua divisão em ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e taninos (proantocianidinas) (Lu e Foo, 1999) e estilbenos (Landrault *et al.*, 2002) que se vai usar nesta dissertação.

2.1.1.1. Ácidos fenólicos

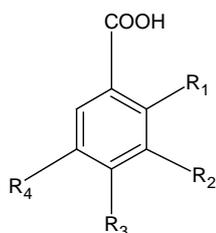
Os ácidos fenólicos compreendem os ácidos benzóicos, com estruturas em C_6-C_1 , e os ácidos cinâmicos, com estruturas em C_6-C_3 . Devido a serem hidroxilados, os ácidos mencionados são designados por ácidos hidroxibenzóicos (AHB) e ácidos hidroxicinâmicos (AHC), e podem ocorrer na forma livre ou associados a outras moléculas. Na classe dos ácidos fenólicos estão os derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, frequentemente na forma de ésteres de ácido tartárico (Baranowski e Nagel, 1981).

Os ácidos fenólicos encontram-se distribuídos na casca e na polpa da uva e os seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (Macheix *et al.*, 1991; Penna *et al.*, 2001).

As uvas e os vinhos têm ácidos fenólicos na ordem de 100 a 200 mg/L em vinho tinto e 10 a 20 mg/L em vinho branco (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Dentro dos AHB foram identificados: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido siríngico, ácido salicílico (ácido orto-hidroxibenzóico) e ácido gentísico (ácido 2',5'-di-hidroxibenzóico), **Figura 2.2** (Naczki e Shahidi, 2004). Estes quando sofrem substituições nas posições *meta* e

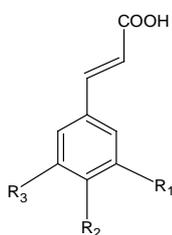
para dão origem, por exemplo, ao ácido gálico. Alguns vinhos que sofrem envelhecimento em barril apresentam altos níveis de ácido gálico.



Ácido	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H
protocatéquico	H	OH	OH	H
vanílico	H	OCH ₃	OH	H
gálico	H	OH	OH	OH
siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
salicílico	OH	H	H	H
gentísico	OH	H	H	OH

Figura 2.2 - Estrutura química de ácidos hidroxibenzoicos (adaptado de Naczk e Shahidi, 2004)

Em relação aos AHC foram identificados: ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico, **Figura 2.3** (Naczk e Shahidi, 2004). As suas estruturas derivam do ácido cinâmico por substituição do anel aromático. A presença da cadeia lateral com uma ligação dupla origina a possibilidade de ocorrência de formas isoméricas *cis* e *trans*. Na natureza, os compostos ocorrem essencialmente na forma *trans*, no entanto, a interconversão das duas formas pode ocorrer facilmente, quer por isomerização fotoquímica ou enzimática (Strack, 1997).



Ácido	R ₁	R ₂	R ₃
<i>p</i> -cumárico	H	OH	H
caféico	OH	OH	H
ferúlico	OCH ₃	OH	H
sinápico	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figura 2.3 - Estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos (adaptado de Naczk e She Shahidi, 2004)

Os ácidos fenólicos não apresentam cor numa solução hidroalcoólica, mas podem ficar com cor amarela devido à oxidação.

2.1.1.2. Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em folhas, flores, frutos e sementes de diferentes plantas medicinais, assim como em bebidas, tais como vinho (particularmente tinto), chá e cerveja (Merken e Beecher, 2000). Geralmente ocorrem na natureza ligados a açúcares e contribuem para as cores brilhantes azul, escarlate e laranja em folhas, flores e frutos.

Os flavonóides têm diversos papéis na ecologia e bioquímica das plantas. Algumas das suas funções incluem: atração de polinizadores, proteção da radiação UV, controlo da respiração, defesas contra infeções e estimulação da bactéria *Rhizobium* para a fixação de azoto. No entanto, o organismo humano não consegue produzir estas substâncias protetoras, mas pode obtê-las mediante a alimentação ou em forma de suplementos. Uma propriedade fundamental destas moléculas, responsáveis por muitos efeitos benéficos, é a sua atividade antioxidante, devido à sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres e sua eliminação. Esta atividade dos flavonóides confere-lhe um potencial terapêutico em doenças cardiovasculares, úlceras gástricas ou duodenais, cancro ou patologias hepáticas. Também, são importantes as suas ações antivirais e anti-alérgicas, assim como as propriedades anti-trombóticas e anti-inflamatórias (Pietta, 2000).

Um grande número de publicações científicas refere que alguns destes compostos são sequestradores eficientes de diversas espécies reativas de oxigénio e azoto, potentes agentes hepatoprotetores e inibidores da peroxidação de proteínas de baixa densidade induzida por iões cobre (III), atividades muito importantes na proteção do organismo humano (Merken e Beecher, 2000).

Os flavonóides são formados nas plantas a partir dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) e malonato. A estrutura básica é o núcleo flavano, que consiste em 15 átomos de carbonos organizados em três anéis (C₆-C₃-C₆), designados por A, B e C (Pietta, 2000). Os anéis A e B são benzênicos, enquanto que o anel C é um grupo pirano, heterocíclico com oxigénio (**Figura 2.4**) (Merken e Beecher, 2000). As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e forma de substituição no anel C, enquanto que os compostos individuais dentro da classe diferem na forma de substituição nos anéis A e B (Pietta, 2000).

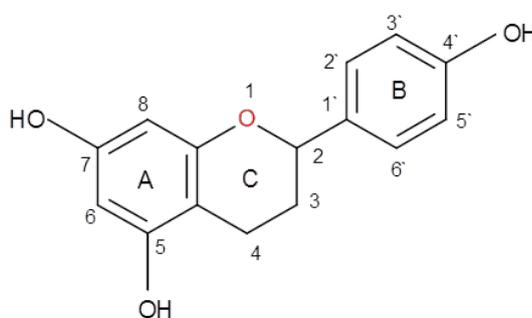


Figura 2.4 - Estrutura química base dos flavonóides (adaptado de Hertog *et al.*, 1992).

Os flavonóides encontram-se na natureza sob a forma de glicosídeos, o que promove uma melhor absorção intestinal e uma maior bioavaliabilidade destes compostos (Yilmaz e Toledo, 2004). No entanto, o glicosídeo apresenta menor reatividade na neutralização de radicais livres do que o flavonóide correspondente, bem como uma maior hidrossolubilidade (Flores *et al.*, 2002).

Os glicosídeos formam-se através da união de resíduos de D-glucose à posição 3 ou posição 7 destes flavonóides, sendo a primeira substituição mais frequente. Outros resíduos de açúcares que também se podem encontrar ligados a estes tipos de compostos são a D-galactose, a L-ramnose, a L-arabinose, a D-xilose e o ácido glucurónico (Flórez *et al.*, 2002).

Os flavonóides encontram-se no estado livre (agliconas) ou ligados (derivados glicosilados) (Pietta, 2000). Podem também polimerizar com outros flavonóides (Cabrita *et al.*, 1999).

A estrutura química dos flavonóides favorece a sua atividade antioxidante. Os hidrogénios dos grupos hidroxilo adjacentes (*orto*-difênóis), localizados em várias posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função ceto ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonóides fornecem a esses compostos alta atividade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Os flavonóis são compostos caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico, uma ligação dupla em C-2 e um grupo hidroxilo em C-3. Na **Figura 2.5** encontram-se representadas as agliconas mais importantes: quenferol, quercetina e miricetina (Cabrita *et al.*, 1999), todos originários nas películas das uvas tintas e brancas, embora o vinho branco apenas contenha quenferol e quercetina. São os compostos que existem em maior quantidade no vinho e têm cor amarela. No vinho tinto existem na ordem das 100 mg/L, enquanto que no vinho branco variam entre 1 a 3 mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*; 2000).

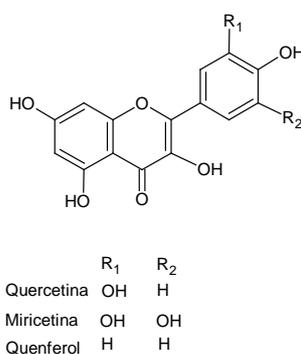


Figura 2.5 - Estrutura química base dos flavonóis (adaptado de Hertog *et al.*, 1992).

As flavonas têm um hidrogénio em C-3 que as difere dos flavonóis (**Figura 2.6**) (Hertog *et al.*, 1992).

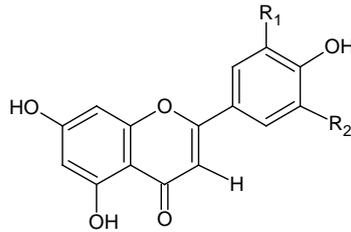


Figura 2.6 - Estrutura química base das flavonas (adaptado de Hertog et al., 1992).

As flavanonas são derivadas da estrutura das flavonas por redução da ligação dupla no anel heterocíclico central (**Figura 2.7**).

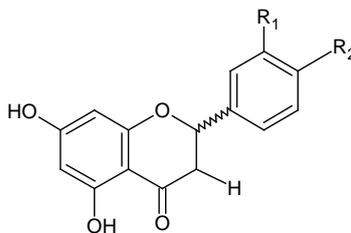


Figura 2.7 - Estrutura química base das flavanonas (adaptado de Merken e Beecher, 2000).

Os 2,3-di-hidroflavonóis são derivados das estruturas dos flavonóis por redução da ligação dupla no grupo heterocíclico central (**Figura 2.8**). A estilbina (**Figura 2.9**), que ocorre de forma original nos vinhos tintos em concentrações que variam entre 8,24 a 15,13 mg/L (Landrault et al., 2002), e a engeletina são exemplos destas estruturas (**Figura 2.10**) (Lu e Foo, 1999).

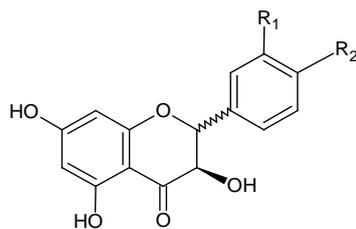


Figura 2.8 - Estrutura química base dos 2,3-di-hidroflavonóis (adaptado de Pietta, 2000).

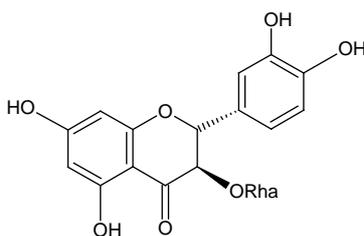


Figura 2.9 - Estrutura química da estilbina, um 2,3-di-hidroflavonol (adaptado de Landrault *et al.*, 2002).

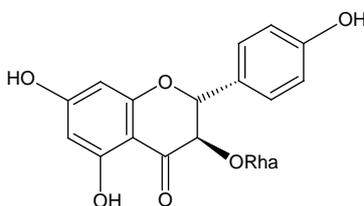


Figura 2.10 - Estrutura química da engeletina, um 2,3-di-hidroflavonol (adaptado de Lu e Foo, 1999).

2.1.1.3. Antocianinas ou Antocianas

As antocianinas encontram-se associadas a um ião sob a forma de sal. Representam-se pelo catião flavílio (**Figura 2.11**) (Naczki e Shahidi, 2004).

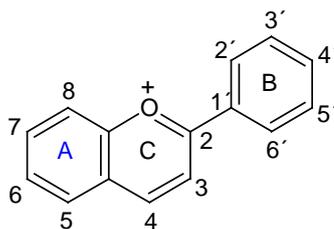


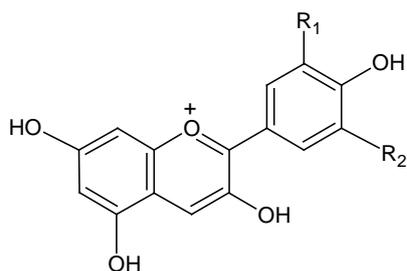
Figura 2.11 - Estrutura química do catião flavílio (adpatado de Pietta, 2000).

As antocianinas constituem o grupo mais importante de pigmentos de plantas. São solúveis em água e visíveis ao olho humano. A sua cor varia desde o vermelho ao violeta, passando pelo azul. Correspondem aos pigmentos vermelhos das uvas tintas. Localizam-se na película e na polpa de castas tintas (Cabrita *et al.*, 1999; Dell`Agli *et al.*, 2004). Estão presentes no vinho tinto na ordem de 200 a 500 mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

A cor das antocianinas varia consoante as estruturas químicas e as condições físico-químicas do meio. Geralmente a cor varia desde o vermelho ao azul com o aumento dos grupos hidroxilo e o efeito inverso quando se substituem estes grupos por grupos metoxilo (Cabrita *et al.*, 1999).

As antocianinas são glicosídeos de poli-hidroxilo ou polimetoxilo dos sais de flavílio (2-fenil-benzopirilo). Elas diferenciam-se pelo número de grupos hidroxilo e o grau de metilação destes presentes no anel lateral, o número e a natureza dos açúcares ligados à molécula, e o número e natureza das cadeias alifáticas esterificadas com os açúcares (Cabrita *et al.*, 1999).

Estes compostos são muito mais estáveis e solúveis na forma glicosilada (antocianinas) do que na forma aglícona (antocianidinas) (Cabrita *et al.*, 1999), isto é, as antocianinas são as agliconas livres das antocianidinas (Dell`Agli *et al.*, 2004). As antocianidinas cianidina (pigmentação vermelha), peonidina (vermelho escuro), delphinidina (azul), petunidina (vermelho escuro) e malvidina (púrpura) são as mais abundantes no género *Vitis* e do vinho tinto, **Figura 2.12** (Cabrita *et al.*, 1999; Dell`Agli *et al.*, 2004; Naczek e Shahidi, 2004). As suas quantidades relativas variam com a casta, mas a malvidina é sempre maioritária (Cabrita *et al.*, 1999).



Cianidina: $R_1 = OH$; $R_2 = H$
 Delfinidina: $R_1 = OH$; $R_2 = OH$
 Malvidina: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$
 Petunidina: $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$
 Peonidina: $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$

Figura 2.12 - Estruturas químicas das antocianinas mais abundantes no vinho (adaptado de Merken e Beecher, 2000).

As antocianinas características das *Vitis vinifera* possuem uma molécula de glucose ligada na posição 3, **Figura 2.13** (Cabrita et al., 1999), que é responsável pela sua solubilidade e estabilidade. Estes são os compostos responsáveis pelas mudanças de cor nos vinhos tintos (Larrauri et al., 1999).

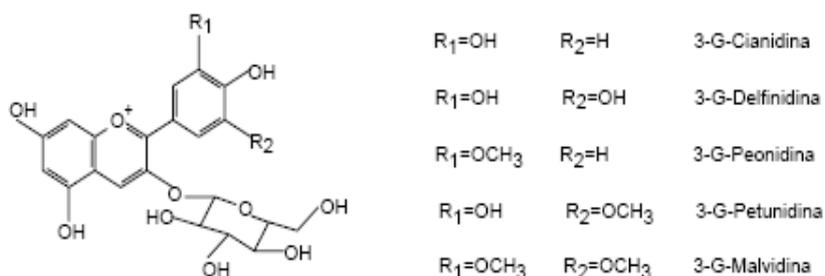


Figura 2.13 - Estrutura das antocianinas glucosiladas (Cabrita et al., 1999).

As diferentes reações de oxidação, condensação e polimerização durante o envelhecimento do vinho tinto produzem mudanças de cor no vinho envelhecido e uma transição gradual de antocianinas monoméricas através de oligómeros a

pigmentos poliméricos mais estáveis, a partir de antocianinas tal como a malvidina-3-glucósido (Larrauri *et al.*, 1999). O conteúdo de antocianinas (malvidina-3-glucósido) em vinhos tintos novos (consumo antes da próxima vindima) varia de 19,2 a 92,9 mgL⁻¹, em velhos (envelhecimento pelo menos em carvalho de 6 meses e 18 meses em garrafa) de 4,6 a 46,5 mgL⁻¹ e nas reservas (envelhecimento pelo menos em carvalho de 12 meses e 24 meses em garrafa) de 7,6 a 47,1 mgL⁻¹ (Larrauri *et al.*, 1999).

2.1.1.4. Taninos

Os taninos são grupos de compostos fenólicos de elevada massa molecular capazes de se combinar com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos, provocando a sensação de adstringência, que não é mais do que a perda do efeito de lubrificação da saliva por precipitação das proteínas (Cabrita *et al.*, 1999). Estas moléculas localizam-se nas grainhas e películas das uvas. No vinho tinto existem na ordem de 1 a 3 g/L, enquanto que no vinho branco existem em algumas dezenas de mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Podem existir na forma de taninos hidrolisáveis: galotaninos e elagitaninos, e taninos condensados (proantocianidinas): monómeros de catequina e epicatequina.

A estrutura dos taninos hidrolisáveis consiste num polioliol ao qual estão ligados unidades de ácido gálico ou elágico. Os taninos hidrolisáveis mais simples são ésteres do ácido gálico e um polioliol alifático (quase sempre a D-glucose), **Figura 2.14** (Naczek e Shahidi, 2004). Estes compostos não contêm moléculas de flavonóides e não aparecem naturalmente nas uvas. Eles estão presentes na madeira e por isso podem aparecer em vinhos armazenados ou envelhecidos em barris em madeira (Cabrita *et al.*, 1999).

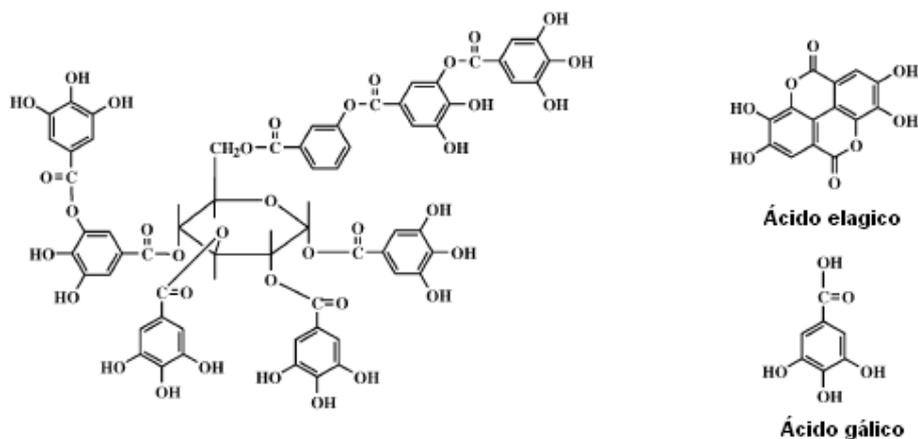


Figura 2.14 - Estrutura química de um tanino hidrolisável (adaptado de Naczk e Shahidi, 2004).

Os taninos condensados ou proantocianidinas aparecem nas uvas e são formados por moléculas de flavanóis. Encontram-se fundamentalmente nas grainhas e não são facilmente hidrolisáveis (Cabrita *et al.*, 1999).

A unidade estrutural fundamental das proantocianidinas é o núcleo flavan-3-ol (3-hidroxi flavano), (**Figura 2.15**) (Sun e Spranger, 2005).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são oligómeros (2 a 5 unidades monoméricas) (Auger *et al.*, 2004) ou polímeros (mais de 5 unidades monoméricas) (Auger *et al.*, 2004) de elevado peso molecular, formados por unidades de 3-hidroxi flavano unidas por ligações de C-C (Dell`Agli *et al.*, 2004; Naczk e Shahidi, 2004).

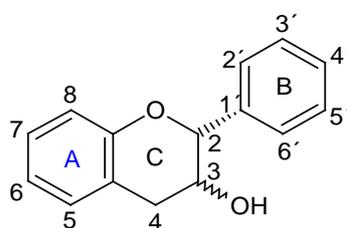


Figura 2.15 - Estrutura química do núcleo 3-hidroxi flavano (adaptado de Sun e Spranger, 2005).

A estrutura do núcleo 3-hidroxi flavano é diversamente substituída, em particular hidroxilada, nas posições C5 e C7 no anel A, na posição C3 no anel heterocíclico e na posição C3 e C4 no anel B (catequina e epicatequina) ou na posição C3, C4 e C5 no anel B (galocatequina e epigalocatequina). A hidroxilação permite distinguir as proantocianidinas em várias classes, a destacar as procianidinas (polímeros de catequinas e epicatequinas), e as prodelfinidinas (polímeros de galocatequinas e epigalocatequinas), **Figura 2.16** (Dell`Agli *et al.*, 2004; Sun e Spranger, 2005).

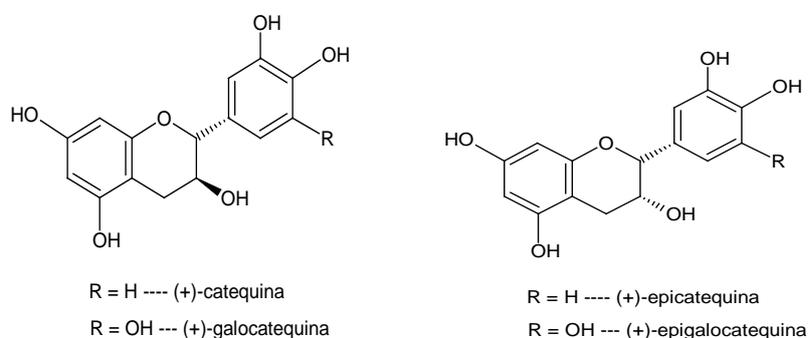


Figura 2.16 - Unidades monoméricas das principais proantocianidinas (adaptado de Sun e Spranger, 2005).

Os oligómeros (procianidinas são as mais abundantes) e polímeros estão presentes nas uvas (*V. vinifera* L.), sementes, pedúnculos e películas (Dell`Agli *et al.*, 2004).

A condensação oxidativa ocorre entre o C4 do anel heterocíclico e o C6 ou C8 das unidades adjacentes (**Figura 2.17**). As segundas (procianidinas diméricas B1-B4) são mais comuns do que as primeiras (procianidinas diméricas-isómeros B5-B8) nas uvas e algumas ramificações podem ocorrer na cadeia de grandes oligómeros e polímeros (Dell`Agli *et al.*, 2004; Sun e Spranger, 2005). Estes compostos sem cor libertam antocianidinas coloridas pela clivagem das ligações C-C do anel inter-flavânião quando aquecidos em meio fortemente ácido e alcoólico (Sun e Spranger, 2005).

A maior proporção de proantocianidinas no tecido das uvas e dos vinhos está sob a forma de oligómeros e polímeros (**Figura 2.17**) (Cabrita et al., 1999).

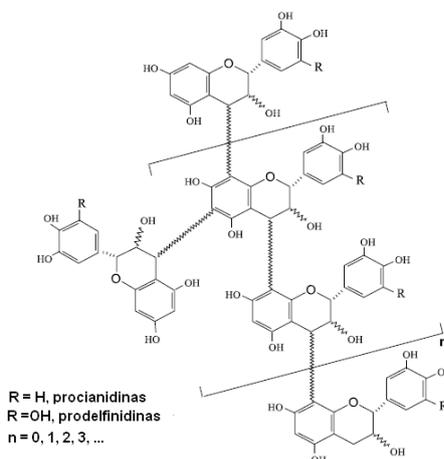


Figura 2.17 - Estrutura química das proantocianidinas (adaptado de Sun e Spranger, 2005).

Num vinho tinto novo, a concentração total das catequinas varia entre 19 a 76 mgL^{-1} , oligómeros entre 65 a 280 mgL^{-1} e polímeros entre 335 a 611 mgL^{-1} . Com o envelhecimento do vinho tinto as concentrações individuais de todos os compostos fenólicos, incluindo as proantocianidinas, são significativamente reduzidas (Sun e Spranger, 2005). Por outro lado, as proantocianidinas estão presentes nas uvas e vinho em formas poliméricas (60-80%), seguidas pelas formas oligoméricas (15-30%), enquanto que os monómeros 3-hidroxiflavano (catequinas) representam só uma pequena proporção (<10%) (Sun e Spranger, 2005).

Para vinhos tintos franceses o teor médio em procianidinas é de 557,7 mgL^{-1} , vinhos brancos de 15,1 mgL^{-1} e vinhos rosés de 17,1 mgL^{-1} ; enquanto que para as uvas o valor é de 377 mgKg^{-1} em fresco, repartindo-se 65% nas sementes, 20% nos pedúnculos, 14% nas películas e 1% na polpa (Auger *et al.*, 2004).

A concentração do tanino aumenta com o envelhecimento do vinho tinto. O conteúdo em tanino para vinhos novos varia de 250,5 a 525 mgL⁻¹, para velhos de 378 a 597,2 mgL⁻¹ e para reservas de 323,4 a 619,4 mgL⁻¹ (Larrauri *et al.*, 1999).

2.1.1.5. Estilbenos

Os estilbenos (1,2-diarilletenos) (**Figura 2.18**) são outra família mais complexa de compostos fenólicos. Têm dois anéis benzênicos ligados por etano ou etileno (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), podem existir como isómeros *cis* e *trans* (Sun e Spranger, 2005), donde ressalta o *trans*-resveratrol (1 a 3 mg/L em vinhos tintos) pelas suas características antioxidantes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Os estilbenos podem ser monómeros (*trans*-resveratrol, *trans*-astringina e *trans*-“piceid”) e oligómeros: viniferina (0,1-1,63 mg/L) e palidol (0,38-2,22 mg/L) (Landrault *et al.*, 2002).

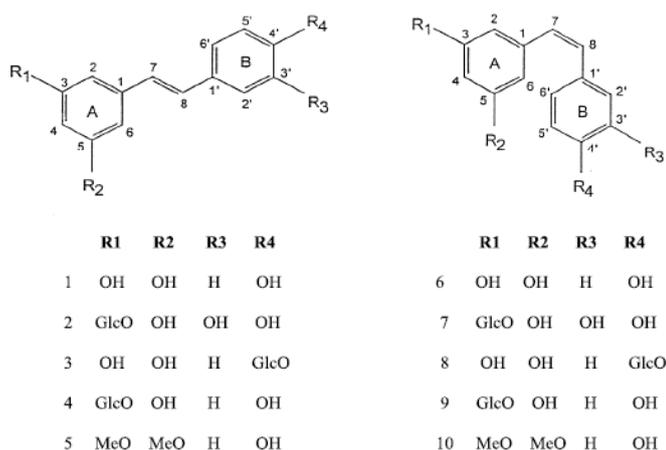


Figura 2.18 - Estruturas químicas de estilbenos monómeros identificados no género *Vitis*: 1 e 6: *trans*- e *cis*-resveratrol; 2 e 7: *trans*- e *cis*-astringina; 3 e 8: *trans*- e *cis*-resveratrolósido; 4 e 9: *trans*- e *cis*-“piceid”; 5 e 10: *trans*- e *cis*-pteroestilbeno (Sun e Spranger, 2005).

2.1.2. Propriedades químicas, físicas e biológicas

Os compostos fenólicos são constituintes das uvas e por isso estão presentes no vinho, sendo a sua maior quantidade no vinho tinto do que no branco (Kanner *et al.*, 1994; Jang *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2009) e os sub-produtos e resíduos da vinificação, na sua maioria, podem manter quantidades apreciáveis.

Os compostos fenólicos presentes no vinho são ácidos fenólicos, flavonóides (flavonóis e flavanonóis), antocianinas e taninos (proantocianidinas). A catequina e a epigalocatequina são os compostos fenólicos maioritários do vinho branco. No vinho tinto a catequina e o ácido gálico são os compostos fenólicos em maior abundância (Katalinić *et al.*, 2004). Os compostos fenólicos estão relacionados com a bem conhecida atividade antioxidante de vinhos tintos (Aguirre *et al.*, 2009). Apresentam múltiplos efeitos benéficos para a saúde humana, incluindo as atividades vasodilatadoras com propriedades arteroscleróticas, as anti-inflamatórias, as anticancerígenas, as antivirais e os efeitos antibacterianos (Soleas *et al.*, 2002; Katalinić *et al.*, 2004; Quirós *et al.*, 2009; Radovanović *et al.*, 2009; Rastija e Šarić, 2009; Yang *et al.*, 2009), que proporcionam um efeito protetor contra acidentes vasculares e doenças neurodegenerativas (Virgili e Contestabile, 2000; Katalinić *et al.*, 2004). Têm, ainda, ação no tratamento de problemas circulatórios pela inibição da oxidação das proteínas de baixa densidade (LDL) (Katalinić *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2009; Mudnic *et al.*, 2010). Os benefícios para a saúde dos polifenóis surgem dos efeitos antioxidativos, baseados na capacidade de sequestrar os diferentes radicais livres que conduzem à proteção de moléculas biológicas contra a oxidação (Rastija e Šarić, 2009; Mudnic *et al.*, 2010).

O vinho tinto representa uma fonte rica de compostos fenólicos tais como as antocianinas e as proantocianidinas que são os mais determinantes na sua qualidade, porque influenciam a cor, o amargor, a adstringência e a estabilidade química para a oxidação (Dell'Agli *et al.*, 2004; Monagas *et al.*, 2006), e o sabor, sendo também os principais responsáveis pelo seu poder antioxidante (Katalinić *et al.*, 2004).

A adstringência e o amargor dos vinhos novos são devidos aos ácidos fenólicos e taninos condensados. Os ácidos hidroxicinâmicos (AHC) e taninos condensados, juntos com os flavonóis, também actuam como copigmentos de antocianinas (Monagas *et al.*, 2006).

As antocianinas são progressivamente transformadas em pigmentos oligoméricos e poliméricos mais estáveis, os quais dão origem a importantes alterações na cor (do vermelho vivo ao vermelho tijolo) e na adstringência dos vinhos, devido a mecanismos como reacções de condensação que ocorrem durante o envelhecimento do vinho tinto (Monagas *et al.*, 2006).

Na vida aeróbia, os organismos não conseguem sobreviver sem oxigénio e, paradoxalmente, esse oxigénio constitui um perigo potencial por ser responsável pela formação de compostos intermediários parcialmente reduzidos e dotados de uma elevada reatividade – as espécies reativas de oxigénio (ROS).

Os compostos fenólicos são importantes antioxidantes naturais devido aos seus elevados potenciais redox que permitem que estes compostos sejam bons agentes redutores, dadores de hidrogénio e com capacidade de reagir com espécies reativas de oxigénio. O incremento dos efeitos depende do número e posição dos grupos hidroxilo (Vitaglione e Fogliano, 2004).

O processo oxidativo é iniciado através da oxidação de derivados do catecol tais como a (+)-catequina / (-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico e os seus ésteres, e o ácido cafeico, que constituem a família de compostos fenólicos mais facilmente oxidáveis no vinho (Singleton, 1987; Singleton, 2000; Kilmartin *et al.*, 2001). Estes compostos são oxidados sequencialmente a quinonas e semiquinonas, enquanto que o oxigénio é reduzido a radicais hidroperoxilo e peróxido de hidrogénio. Os fenóis são usados como inibidores de reacções envolvendo radicais livres e funcionam como terminadores de reacções radicalares. Este processo é catalizado pelo ciclo redox Fe^{3+}/Fe^{2+} . O peróxido de hidrogénio é depois reduzido pelo Fe^{2+} , pela reacção de Fenton, a radicais hidroxilo capazes de oxidar grupos hidroxilo de compostos saturados. Radicais intermédios podem, também, reagir com o oxigénio formado por uma via adicional para a sua redução. Assim, ambos os iões férrico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}), que estão presentes no vinho, apresentam uma função catalítica muito importante.

Os compostos fenólicos têm na atualidade um papel importante na nutrição e na saúde humana devido à sua atividade antioxidante, pela presença de substituintes de hidroxilo e estrutura aromática (Villaño *et al.*, 2007), que permitem eliminar radicais livres e inibir a oxidação da lipoproteína; a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) tem sido sugerida como a principal causa das doenças cardiovasculares (Lu e Foo, 1999). Os flavonóides, uma das classes mais importantes, possuem um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular, além de manifestarem propriedades antivirais, anti-inflamatórias, antialérgicas, e outras (Hertog *et al.*, 1992; Robards e Antolovich, 1997; Bravo, 1998; Merken e Beecher, 2000; Pietta 2000).

Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que o aumento da ingestão de compostos fenólicos antioxidantes está correlacionado com a redução da doença cardíaca coronária. Isto poderá ajudar a explicar o “paradoxo Francês”, ou seja, a baixa taxa de mortalidade por doença cardíaca entre populações que regularmente bebem vinho tinto embora a sua dieta seja rica em gorduras saturadas. De fato, os vinhos tintos contêm compostos fenólicos em níveis elevados (Lu e Foo, 1999), um grande número dos quais podem atuar como antioxidantes, com envolvimento de ambos os mecanismos de eliminação de radicais livres e de quelatação de metais (Ghiselli *et al.*, 1998).

Evidências científicas consolidadas suportam a hipótese de participação das LDL modificadas oxidativamente na patogenia da arterosclerose. A susceptibilidade da LDL para modificações oxidativas é modulada pela composição dos ácidos gordos e nível da concentração no plasma dos antioxidantes. Um número de antioxidantes naturais tem sido encontrado para estreitar a resistência das LDL para modificações oxidativas. O vinho tinto tem efeito positivo na modulação à resistência das LDL humanas contra modificações oxidativas (Ghiselli *et al.*, 1998).

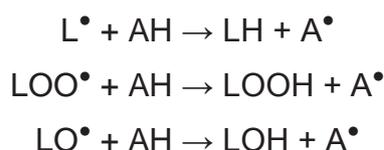
2.2. Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação daquele substrato de modo eficaz”. Dividem-se em duas classes:

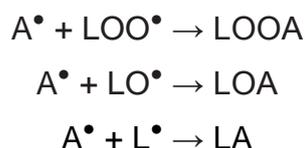
- antioxidantes primários ou antioxidantes de quebra de cadeia;
- antioxidantes secundários ou antioxidantes preventivos (Antolovich *et al.*, 2001), também designados de sinergistas (Sikorski e Kolakowska, 2003).

Os antioxidantes secundários são compostos que retardam a taxa de oxidação por diferentes mecanismos (eliminação do substrato ou eliminação do oxigénio singlete) (Antolovich *et al.*, 2001; Sikorski e Kolakowska, 2003).

Os antioxidantes primários (AH) funcionam como electrão ou dador de hidrogénio aos radicais antioxidantes primários (A[•]), regenerando o antioxidante primário (Madhavi, *et al.*, 1996). Reagem com os radicais lipídicos (L[•]) produzindo produtos estáveis (Sikorski e Kolakowska, 2003) que podem atrasar ou inibir a etapa de iniciação pela reação com um radical lipídico ou inibir a etapa de propagação pela reação com radicais peroxilo ou alquilo (Antolovich *et al.*, 2001; Belitz *et al.*, 2004):



O radical livre antioxidante pode posteriormente interferir com a reação de cadeia de propagação formando compostos antioxidantes peroxilo (Antolovich *et al.*, 2001), que são produtos finais não reactivos e estáveis (Belitz *et al.*, 2004):



A energia de ativação das reações anteriores aumenta com os incrementos da energia de dissociação das ligações A-H e L-H. Por consequência, a eficiência

do antioxidante aumenta com o decréscimo da força de ligação A-H (Antolovich *et al.*, 2001).

Os antioxidantes, segundo o seu modo de ação, podem ser classificados como radicais livres terminadores, quelantes dos íons metálicos capazes de catalizar a oxidação lipídica, ou como eliminadores de oxigénio que reagem com o oxigénio em sistemas fechados (**Figura 2.19**). Esta classificação parte do princípio de que a auto-oxidação lipídica é uma reação de cadeia de radicais livres segundo as etapas de iniciação, propagação e terminação (Moreno *et al.*, 1998).

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir ou atrasar a taxa de oxidação, um dos principais processos da deterioração dos alimentos, afectando a segurança, cor, sabor e textura dos alimentos (Moreno *et al.*, 1998), na reação de cadeia de radicais livres em matérias auto-oxidáveis. Os radicais livres são muito destrutivos para os lípidos, levando à formação de aromas desagradáveis, e igualmente para as células humanas, pela interferência nas reações metabólicas (Louli *et al.*, 2004).

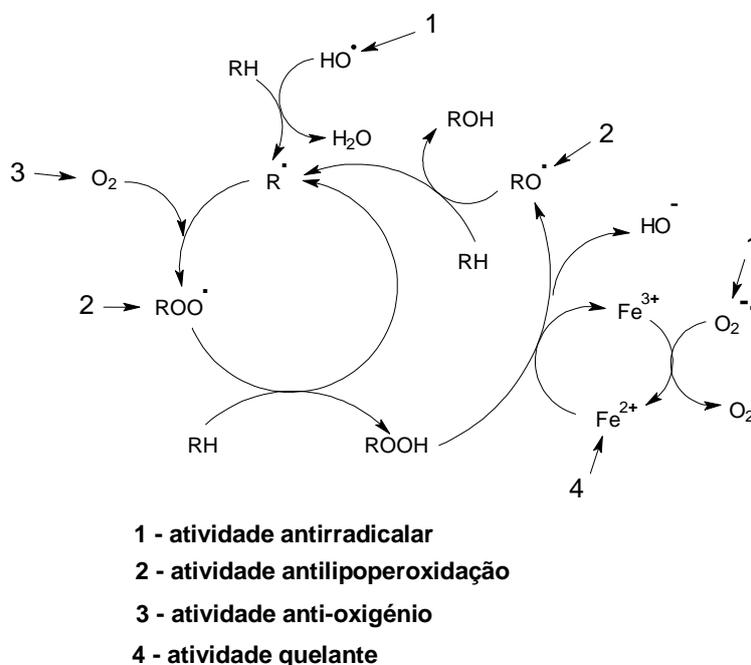


Figura 2.19 - Mecanismo da atividade antioxidante (adaptado de Papas, 1999)

A deterioração oxidativa pode ser impedida ou retardada pelo uso de antioxidantes sintéticos ou naturais. Por razões toxicológicas, atualmente, o uso de antioxidantes naturais na indústria alimentar mostra ser um incremento vantajoso em relação aos antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes comerciais mais utilizados são o tocoferol, o ácido ascórbico e alguns extractos de plantas (rosmaninho, salva, chá verde) (Moreno *et al.*, 1998; Louli *et al.*, 2004).

Contudo, a recuperação de antioxidantes a partir dos sub-produtos da indústria vitivinícola é de grande importância, não só pelas propriedades antioxidantes, antimutagénicas, anti-inflamatórias, anti-úlceras, anti-carcinogénica e anti-microbiana, e também, pela redução do risco de doenças cardiovasculares, mas também porque poderia utilizar uma grande quantidade de resíduos da indústria vinícola, os quais são usados na alimentação animal (Moreno *et al.*, 1998; Louli *et al.*, 2004), na produção de ácido cítrico (Lu e Foo, 1999) ou transportados para aterros (Louli *et al.*, 2004). Consequentemente, o seu impacto ambiental poderá ser reduzido (Louli *et al.*, 2004).

A auto-oxidação em sistemas biológicos e alimentares tem várias implicações, não só para a saúde humana e estado nutricional, mas também para uma vasta área da ciência e tecnologia alimentar (Madhavi *et al.*, 1996). A auto-oxidação de lípidos e a geração de radicais livres são fenómenos naturais em sistemas biológicos e alimentares.

Nos sistemas biológicos existem várias defesas bioquímicas, tais como, enzimas, minerais, vitaminas antioxidantes e “antioxidantes exógenos”. Nos sistemas alimentares os antioxidantes que ocorrem naturalmente dão uma certa quantidade de protecção contra a oxidação. Contudo, perdem-se durante o processamento ou armazenamento, necessitando da adição de “antioxidantes exógenos”. Retardam e/ou impedem o início da oxidação lipídica, aumentando o tempo de vida de prateleira dos produtos alimentares, sem perda do valor nutricional e características sensoriais (Madhavi *et al.*, 1996).

Nos sistemas biológicos, a formação dos radicais livres orgânicos é favorecida por diversos agentes e mecanismos tais como a radiação, a elevada tensão de oxigénio e o metabolismo xenobiótico. São espécies muito reativas que reagindo com o oxigénio molecular originam radicais peróxido (ROO^{\bullet}) e

hidroperóxidos (ROOH) podendo iniciar reações em cadeia causando lesões celulares em todos os órgãos superiores por danos nos componentes celulares, tais como os ácidos gordos polinsaturados, fosfolípidos, colesterol, DNA e proteínas. Associam-se, assim, a doenças cardiovasculares, a situações inflamatórias, a certas formas de cancro (Madhavi *et al.*, 1996) e envelhecimento precoce celular (Papas, 1999).

Nos sistemas alimentares, de entre as principais reações, destaca-se o escurecimento enzimático e a oxidação de lípidos. A oxidação de lípidos, durante o processamento e o armazenamento dos alimentos, é catalizada pelo calor, luz, radiação ionizante, iões metálicos, metaloproteínas e enzimas (lipoxigenase) (Cadenas e Packer, 1996; Madhavi *et al.*, 1996).

Os mecanismos da ação antioxidante incluem: I) supressão da formação das espécies reativas de oxigénio (ROS) pela inibição enzimática ou quelação; II) eliminação das ROS; e III) hiper-regulação ou protecção das defesas antioxidantes (Pietta, 2000).

Segundo o critério acima descrito, os flavonóides inibem as enzimas responsáveis pela formação do anião superóxido e outras envolvidas na geração das ROS e quelatam os metais que têm um papel importante no metabolismo do oxigénio. O ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+) são potenciais incrementadores da formação de ROS, como exemplificado pela redução do H_2O_2 com geração do radical HO^\bullet de elevada agressividade,



ou pela oxidação das LDL mediada pelo cobre (Cu^+) e oxigénio molecular (O_2),



em que o LH representa as LDL (Pietta, 2000).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos presentes no vinho estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio, que por sua vez, depende da sua estrutura química (Quirós *et al.*, 2009; Rastija e Šarić, 2009). A atividade antioxidante e antirradicalar dos flavonóides estão relacionadas com a presença de dois grupos hidroxilo vizinhos no anel B, com o número de grupos hidroxilo livres, com uma ligação dupla na posição 2,3 no anel C, ou com a presença de um grupo 3-hidroxilo. Para a

atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e os seus ésteres um parâmetro importante é o número de grupos hidroxilo na molécula e a presença de impedimento estéreo (Rastija e Šarić, 2009). O número de grupos hidroxilo nas moléculas da quercetina, catequina e cianidina no anel B é o mesmo, mas a atividade antioxidante dessas moléculas é diferente. A dupla ligação na posição 2,3 e a função oxo (-C=O) no anel C da quercetina proporciona-lhe uma maior atividade antioxidante em comparação com a catequina. A cianidina não tem a função oxo (-C=O) no anel C, mas conta com três duplas ligações que podem fazer conjugação e apresentar, praticamente, a mesma atividade antioxidante da quercetina. Não só os grupos hidroxilo do anel C são importantes para a atividade antioxidante dos flavonóides, mas também os do anel B. A molécula do campferol apresenta baixa atividade antioxidante quando comparada com a da quercetina, pois no anel B só há um grupo hidroxilo. A miricetina possui um terceiro grupo hidroxilo no anel B, mas isto não aumenta a sua atividade antioxidante em relação à quercetina. A epigallocatequina é a molécula de catequina com mais um grupo hidroxilo no anel B. Esse grupo hidroxilo é responsável pela maior atividade antioxidante em relação à catequina, mas não em relação à quercetina. A quercetina é o flavonóide do vinho que apresenta a maior atividade antioxidante (Rice-Evans et al., 1996). A catequina constitui o polifenol mais abundante do vinho tinto, mas sua atividade antioxidante é menor que a da quercetina e do ácido gálico.

Os antioxidantes são conhecidos por usar ambos os efeitos antioxidante e pró-oxidante, dependendo das suas concentrações (Vitaglione e Fogliano, 2004). Vários estudos sugerem que alguns compostos fenólicos, quando ingeridos em concentrações elevadas, podem apresentar certas funções na carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade da tiróide, e podem estar ligados com a actividade estrogénica (Radovanović et al., 2009).

2.2.1. O método de DPPH•

Os compostos fenólicos têm propriedades antioxidantes, e quando são considerados eliminadores de radicais livres, a sua atividade antioxidante depende da sua estrutura química, especificamente depende da sua capacidade de doar o hidrogénio ou o eletrão e da sua capacidade de deslocar o eletrão desemparelhado no interior da estrutura benzénica. As propriedades antioxidantes estão também relacionadas com a proteção biológica das moléculas contra a oxidação (Villaño *et al.*, 2005).

Este método é baseado na medição da eliminação de radicais livres dos compostos antioxidantes usando DPPH• em solução de metanol ou etanol, com diferentes tempos de reação (30 min no método original; tempos curtos como 5 min ou 10 min; ou seguir a reação até ao tempo de estado de equilíbrio (Molyneux, 2004)) e estudo do comportamento cinético da eliminação do radical livre. Através da seleção dos parâmetros cinéticos determina-se a eficiência antioxidante (Moreno *et al.*, 1998).

A espectrofotometria é a técnica mais utilizada para avaliar a reação de descoloração do DPPH• produzida pela adição do antioxidante, num comprimento de onda variável entre 515-528 nm, para a medição da absorvância (Moreno *et al.*, 1998).

A adição de um antioxidante resulta num decréscimo da absorvância proporcional à concentração e à atividade antioxidante do próprio composto a estudar (Villaño *et al.*, 2007).

A molécula de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo é um radical livre estável (**Figura 2.20**). Devido à deslocalização da carga (electrão cedido), a molécula não dimeriza. Origina uma cor violeta intensa caracterizada pela absorção de uma banda entre 515-528 nm na zona visível, numa solução contendo etanol (Molyneux, 2004) ou metanol (Moreno *et al.*, 1998; Villaño *et al.*, 2007).

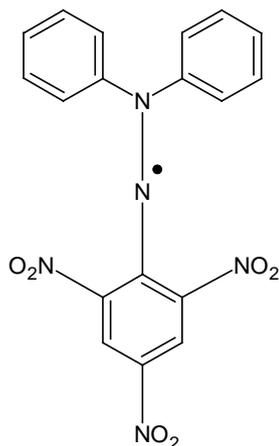


Figura 2.20 - Radical livre de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (adaptado de Molyneux, 2004).

Quando uma solução de DPPH[•] é misturada com uma substância que possa doar átomos de hidrogénio, a molécula DPPH[•] passa à forma reduzida, 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, não radicalar (**Figura 2.21**), com perda da cor violeta e aparecimento de uma cor amarela pálida residual atribuída ao grupo picrilo ainda presente (Molyneux, 2004).

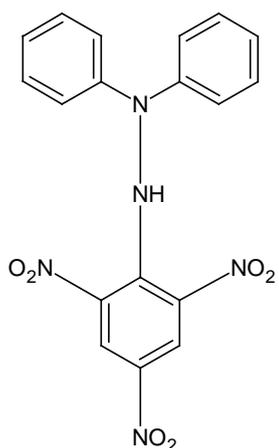
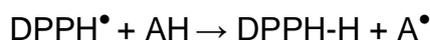


Figura 2.21 - Forma não radicalar 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (adaptado de Molyneux, 2004).

Este método baseia-se na reação entre o radical estável, 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH[•]) em solução de metanol ou etanol com um composto antioxidante ou com outro qualquer composto com o objectivo de avaliar a sua atividade antioxidante. A redução de DPPH[•], como indicada abaixo, é seguida pela monitorização do decréscimo na sua absorvância durante a reação. Na forma radicalar, o DPPH[•] absorve, mas após redução por um antioxidante (AH) ou espécie radicalar (R[•]), ou radical livre (A[•]) a absorvância desaparece (Williams *et al.*, 1995).



Representando a molécula dadora de átomos de hidrogénio por AH, a forma reduzida do DPPH[•] por DPPH-H e um radical livre produzido pela reação por A[•], este último radical resiste a novas reações que controlam a estequiometria total, isto é, o número de moléculas de DPPH reduzidas (sem cor) por uma molécula redutora. Uma vez que, quanto maior for a deslocalização electrónica, maior é a estabilidade do radical, maior é a facilidade com que a molécula doa os hidrogénios, logo as diferenças dos valores para diferentes compostos é explicada pela sua estrutura química. A reação pretende fornecer a ligação com as reações que ocorrem dentro de um sistema de oxidação, tal como a auto-oxidação lipídica ou outra substância insaturada; a molécula de DPPH[•] representa os radicais livres formados nestes sistemas, cuja atividade é ser suprimida pelas substâncias AH (Molyneux, 2004).

Na maioria dos casos, o grupo funcional que cede o protão ao radical é o grupo hidroxilo (-OH) do antioxidante.

O DPPH[•] é usado para avaliar a atividade dos compostos fenólicos pela transferência de átomos instáveis de H ao radical (Villaño *et al.*, 2007).

A configuração *o*-di-hidroxilo é observada como a principal medida dominante da atividade dos antioxidantes fenólicos (Ordoudi *et al.*, 2006).

Para a avaliação da atividade antioxidante são introduzidos os seguintes parâmetros cinéticos (Laurrari *et al.*, 1999):

- EC₅₀ (EC = "Efficient Concentration"), a concentração eficiente de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração do

substrato inicial de DPPH•; mas não tem em atenção o tempo de reação (Moreno *et al.*, 1998); avalia a atividade de doação total do átomo de H (Villaño *et al.*, 2007);

- T_{EC50} (T_{EC50} = “Time Efficient Concentration”), o tempo de reação necessário para atingir o estado de equilíbrio para a concentração correspondente à EC_{50} (Moreno *et al.*, 1998);
- AE (“Antiradical Efficiency”), a eficiência antirradicalar, um parâmetro para caracterizar os compostos antioxidantes onde $AE = 1 / (EC_{50} \times T_{EC50})$. AE é mais discriminatória do que EC_{50} . Tem em atenção o tempo de reação (Moreno *et al.*, 1998).

Para uma maior atividade antioxidante, um menor valor EC_{50} (Moreno *et al.*, 1998; Molyneux, 2004).

Baseados nos valores de T_{EC50} classifica-se o comportamento cinético de um composto antioxidante da seguinte forma (Moreno *et al.*, 1998):

- rápido: <5 min;
- intermédio: 5-30 min;
- lento: >30 min.

Quanto menor o valor de EC_{50} , menor T_{EC50} e maior AE (Moreno *et al.*, 1998).

A classificação cinética da AE, expressa em $g^{-1}Lmin^{-1}$, de um composto antioxidante varia do seguinte modo (adaptado de Moreno *et al.*, 1998):

- baixa: $AE \leq 82,05$;
- média: $82,05 < AE \leq 410,26$;
- alta: $410,26 < AE \leq 820,51$;
- muito alta: $AE > 820,51$.

Este método dá informação sobre as reações cinéticas (Villaño *et al.*, 2005). A cinética de transferência do átomo de H é importante, porque os radicais livres no organismo são espécies com período de vida curto, o que implica que o impacto de uma substância como um antioxidante depende da rápida reatividade dos radicais livres (Villaño *et al.*, 2007).

As reações dos compostos fenólicos com o DPPH[•] são realizadas na ausência da adição DPPH-H (forma reduzida), diferem de composto para composto (Katalinic *et al.*, 2006).

O método DPPH, pela sua fácil e precisa utilização, é recomendado para medir a atividade antioxidante de frutos, sumos ou extratos vegetais (Moreno, 2002; Katalinic *et al.*, 2006) e de vinhos (Villaño *et al.*, 2007) sendo os seus resultados reprodutíveis e facilmente comparáveis com outros métodos envolvendo radicais livres como é o caso do método do ABTS (Moreno, 2002; Katalinic *et al.*, 2006; Villaño *et al.*, 2007). Este método apresenta a vantagem de usar um radical livre estável e comercial (Villaño *et al.*, 2007).

A escolha do método DPPH neste trabalho, que é baseado na eliminação de radicais livres, deve-se ao facto de, ultimamente, já ter sido extensivamente utilizado para medir a atividade antioxidante do vinho, de ser de fácil e precisa utilização e o radical DPPH[•] apresentar a mesma estequiometria com o ácido gálico, que é um reconhecido composto antioxidante utilizado como referência na avaliação da atividade antioxidante.

2.3. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são um dos principais grupos de macromoléculas do vinho. Têm um papel importante na estabilidade do vinho (Coimbra *et al.*, 2002) e um incremento das propriedades organoléticas (Aguirre *et al.*, 2009), e os seus efeitos dependem da sua composição, estrutura, e concentração nos vinhos. Têm origem nas uvas e nos microorganismos, leveduras durante a fermentação (Coimbra *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2009). Existem nas concentrações de 0,2-2 gL⁻¹ (Boulet *et al.*, 2007). As arabinanas, arabinogalactanas tipo II, ramnogalacturonanas, e galacturonanas provêm dos polissacarídeos pécticos das paredes celulares das uvas, após degradação pela ação das pectinases durante a maturação das uvas e durante os primeiros passos do fabrico do vinho. Os microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) produzem mananas e

manoproteínas (150 mgL^{-1} (Boulet *et al.*, 2007)) durante e após a fermentação. As glucanas são produzidas pelo *Botrytis cinérea*, que pode infetar as uvas (Coimbra *et al.*, 2002).

Os principais polissacarídeos que estão presentes no vinho são as manoproteínas e arabinogalactanas tipo II. As manoproteínas são polissacarídeos neutros compostos principalmente de manose e de quantidades pequenas de glucose, associados com a proteína que pode variar de 2 a 36%. As arabinogalactanas tipo II denominadas, também, de arabinogalactanas-proteínas, devido à pequena proporção de proteína, por vezes presente. O ácido glucurónico, também, é encontrado em quantidades que podem variar entre 3 e 20%. Os diferentes conteúdos em ácidos urónicos conferem-lhes características de ácido fraco ou polissacarídeos mesmo ácidos (Coelho *et al.*, 2011).

Segundo o vinho tinto estudado por Aguirre *et al.*, 2009 apresenta uma mistura complexa de polissacarídeos com atividade antioxidante, a qual pode desempenhar um papel significativo nas propriedades antioxidantes de vinho tinto.

É conhecida a atividade antimutagénica dos polissacarídeos pépticos (Hensel e Meier, 1999) e a redução da absorção intestinal de chumbo pela ingestão de ramnogalacturonanas do tipo II na forma dimérica (Tahiri *et al.*, 2000), para além de todos os efeitos das fibras alimentares que podem ter na diminuição do risco de cancro do cólon e de outras doenças do foro gastrointestinal (McDougall *et al.*, 1996).

2.4. Microencapsulamento

Os processos de encapsulamento foram desenvolvidos entre os anos de 1930 e 1940 pela National Cash Register nos EUA para a aplicação comercial de um corante a partir de gelatina como agente encapsulante mediante um processo de coacervação (Fanger, 1974).

O microencapsulamento é uma tecnologia em expansão com aplicações na indústria alimentar e farmacêutica (Berrocal e Aberger, 1999). É definida como uma tecnologia de inclusão de matérias sólidas, líquidas ou gasosas em microcápsulas, as quais podem libertar o seu conteúdo de forma controlada em condições específicas (Dziezak, 1988).

O microencapsulamento está em expansão com diversas aplicações, não somente na indústria alimentar, como também em outras áreas, como na indústria farmacêutica, na cosmética, na indústria de rações de animais, na área da publicidade e nos pesticidas (Berrocal e Aberger, 1999).

O microencapsulamento é um processo mediante o qual pequenas quantidades indefinidas de líquidos em forma de gotas, sólidos, ou gases denominados de núcleo ou material encapsulado são revestidas por um filme uniforme e contínuo designado de matriz, material de parede ou encapsulante, o qual protege o núcleo das condições adversas do meio, tais como a luz, humidade, oxigénio e interações com outros compostos, aumentando a sua vida útil e promovendo a libertação controlada do encapsulado em condições pré-estabelecidas (Shahidi e Han, 1993; Sheu e Rosenberg, 1995; Risch, 1998; Gouin, 2004; Ghosh, 2006; Barczaka e Kolodziejczyk, 2011). O núcleo pode ser libertado a tempos diferentes, isto é, uma libertação controlada e gradual, dependendo das propriedades do encapsulante ou matriz. Existem diferentes tipos de revestimento que apresentam diferentes níveis de permeabilidade, os quais protegem o núcleo das condições mais severas, e controlam as substâncias que fluem dentro do núcleo e a sua libertação (Dziezak, 1988; Jackson e Lee, 1991; Barczaka e Kolodziejczyk, 2011).

O agente encapsulante, que é basicamente um material polimérico capaz de formar um filme, pode ser selecionado a partir de uma vasta gama de polímeros naturais ou sintéticos, deverá ter algumas características ideais (baixa viscosidade em altas concentrações, fácil manipulação durante o processo de encapsulamento, capacidade para formar emulsões estáveis com o núcleo, baixa higroscopicidade, solubilidade em solventes de grau alimentar, capacidade de promover a libertação controlada no tempo, local e condições desejadas e viabilidade económica (Shahidi e Han, 1993)), dependendo das características

químicas e da finalidade do uso do material do núcleo, das condições de armazenamento e das condições a que será exposto o produto, do processo de encapsulação e das características desejadas para o produto final. Geralmente, polímeros solúveis em água são usados para encapsular núcleos orgânicos, enquanto que núcleos hidrossolúveis são encapsulados por material hidrofóbico (Bakan, 1973).

Na prática, é comum utilizar misturas de dois ou mais agentes encapsulantes devido à dificuldade de um agente isoladamente apresentar a totalidade das características supracitadas.

A gelatina é um agente encapsulante. É uma proteína de origem animal que pode ser obtida a partir de diferentes origens de colágeno (proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo) por hidrólise parcial ácida ou alcalina, cujas propriedades dependem do processo de obtenção e da matéria-prima (Bell, 1989; Gennadois et al., 2002). A gelatina obtida a partir da hidrólise ácida apresenta um ponto isoelétrico na faixa alcalina próximo dos 9,4, devido às condições do processamento menos rígidas, minimizando modificações no grupo funcional amina o que mantêm o valor próximo do pH do colágeno. A gelatina obtida através de hidrólise alcalina apresenta um ponto isoelétrico ácido na faixa de 4,8 e 5,2, devido a ser submetida a longos tratamentos com reagentes alcalinos e apenas uma pequena porção do grupo funcional amina resiste ao processo (90-95% de ácido carboxílico livre) (Poppe, 1997). É uma mistura heterogênea de proteínas de elevado peso molecular solúveis em água (Budavari, 1996) com capacidade de formação de gel termo-reversível, sendo este formado por uma rede tridimensional, mantida por zonas de junções microcristalinas intermoleculares (Slade e Levine, 1987), sendo, portanto, um gel coloidal (Sobral et al., 2001). Devido ao seu caráter anfotérico (carga negativa acima do seu ponto isoelétrico, pH no qual a carga em solução é neutra, e carga positiva abaixo deste), não é nem ácida nem alcalina, possui ambas as propriedades dependendo da natureza da solução (Budavari, 1996). A gelatina forma um gel a uma concentração mínima de 0,5% num intervalo de pH de 4 a 8. O pH em soluções aquosas para a gelatina tipo A (gelatina de bovino) situa-se entre 4,5 e 6, e para a gelatina tipo B (gelatina de suíno) o pH varia de de

5 a 7 (US FDA, 1997). A base do resíduo seco da gelatina apresenta 98 a 99% de proteína. O peso molecular destas grandes estruturas proteicas normalmente variam entre 20 e 250 KDa (Keenan, 1994), com alguns agregados a pesarem na ordem dos milhões (Poppe, 1997). Apresenta propriedades físico-químicas tais como: incolor ou ligeiramente amarela, transparente, quebradiça, inodora, folhas insípidas, flocos, ou pós; solúvel em água quente, glicerol, e ácido acético; e insolúvel em solventes orgânicos (Budavari, 1996). Pode ser produzida em abundância a baixo custo, com propriedades funcionais interessantes (estabilizador, espessante e texturizador) e amplamente utilizada na indústria alimentar (clarificador de bebidas, coberturas de pastelaria, molhos e sopas instantâneas, filmes comestíveis, pura ou em mistura com outras moléculas na confecção de produtos, estabilizadores em gelados, cremes de queijo e espumas alimentares) (McCormick, 1987; Arvanitoyannis *et al.*, 1998; Gass, 2001; McWilliams, 2001; Sobral *et al.*, 2001). Pelas propriedades de formação de géis e filmes termo-reversíveis, a gelatina apresenta-se como um material muito versátil na obtenção de micropartículas por diversos tipos de processos (Poppe, 1997).

O amido pode aprisionar moléculas devido à capacidade da fração de amilose formar estruturas reticuladas e formar complexos muito estáveis. O amido hidrolisado não oferece propriedades emulsificantes. Para tal deve conter os agrupamentos lipofílicos e hidrofílicos. Perante deste facto, foi incorporado um componente lipofílico, modificando quimicamente o amido (Figueirêdo, 1998).

O Capsul é um amido de milho ceroso e modificado enzimaticamente desenvolvido pela *National Starch and Chemical Corporation* dos EUA, em que o componente lipofílico incorporado foi o succinato de octanilo, aumentando a capacidade e a estabilidade de emulsão nas formulações (King *et al.*, 1976). É utilizado para o encapsulamento de óleos essenciais cítricos, óleos vegetais e uma grande variedade de misturas de compostos voláteis estabilizando-as para uma secagem eficiente por atomização (Ascheri, 1997). É muito usado pela excelente retenção de compostos voláteis (acima de 93%), pela estabilização da emulsão e pela baixa viscosidade (King *et al.*, 1976). A maior estabilização da mistura e a formação de crosta na secagem são as vantagens do Capsul na maximização de componentes do núcleo e minimização destes na superfície,

durante a secagem por atomização (Figueirêdo, 1998). O amido de milho modificado por inclusão do agrupamento lipofílico tem sido o mais utilizado para o encapsulamento de compostos de aroma. É um bom substituto da goma-arábica, pelo menor custo, pelo uso em menor quantidade e pela pronta disponibilidade. O amido modificado também pode ser obtido a partir da mandioca, batata e trigo (Cardello e Celestino, 1996).

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

Tanto quanto sabemos, a atividade antioxidante do resíduo da destilação do vinho ainda não foi estudada. Neste trabalho propõe-se utilizar a destilação a pressão reduzida para obtenção, a partir de excedentes de vinho tinto, de frações ricas em compostos fenólicos com atividade antioxidante; preparar microcápsulas deste material e avaliar a sua possível utilização no desenvolvimento de um alimento funcional com propriedades antioxidantes.

Neste trabalho, como forma de minimizar a exposição às temperaturas de 80-85°C e acidez elevada a que decorre a destilação vínica, propõe-se a destilação a pressão reduzida, em que se utilizam temperaturas de 40°C, que minimizam as alterações das potenciais propriedades biológicas dos compostos. O resíduo líquido desalcoholizado foi fracionado em diversas frações, as quais foram caracterizadas, quanto à quantificação dos compostos fenólicos totais e dos polissacarídeos e quanto à avaliação da atividade antioxidante.

Neste trabalho estudou-se o microencapsulamento como uma tecnologia de preservação da atividade antioxidante dos compostos bioativos do vinho após o seu isolamento, com potencial aplicação na elaboração de alimentos funcionais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras

Foi usado vinho tinto da colheita de 2004, obtido a partir de uma mistura de castas de *Vitis vinifera* L. produzidas no concelho de Estarreja, distrito de Aveiro. O vinho, produzido sob fermentação tradicional (vinificação com maceração), foi armazenado em barricas de madeira, onde permaneceu por um período superior a um ano até à sua utilização neste trabalho.

4.2. Destilação e fracionamento do vinho tinto

Neste trabalho foi utilizado um processo de destilação do vinho tinto a 40°C, para obtenção da fração não volátil, rica em compostos fenólicos de forma a minimizar possíveis alterações nas propriedades físico-químicas e consequente perda das características bioativas dos componentes do vinho decorrentes dos processos térmicos.

Foram utilizados 10 L de vinho tinto. Após a destilação, o resíduo desalcoholizado e concentrado foi decantado para separação do tartarato de potássio e outros componentes insolúveis. Para a separação das partículas que permaneceram em suspensão o sobrenadante foi centrifugado a 15000 rpm durante 15 min a 4°C.

O material precipitado (fração resíduo 1, R1) foi suspenso em água destilada e colocado em porta-amostra de plástico, congelado e liofilizado.

Ao sobrenadante (360 mL) foram adicionados gradualmente 360 mL de etanol absoluto e a solução resultante (50% em etanol, volumes aditivos) foi agitada durante 1 h a 4°C. Esta solução foi centrifugada a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, resultando:

- a fração precipitada em 50% de etanol (EtOH50), que foi dissolvida em água destilada e colocada em porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;

- a fração que permaneceu no sobrenadante (720 mL).

Ao sobrenadante foram adicionados gradualmente 440 mL de etanol absoluto e a solução resultante (70% em etanol) foi agitada durante 4 h a 4°C. Esta solução foi centrifugada a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, resultando:

- a fração precipitada em 70% de etanol (EtOH70), que foi dissolvida em água destilada e colocada em porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;
- a fração que permaneceu no sobrenadante (1160 mL).

O sobrenadante foi evaporado, donde resultaram 200 mL de solução, que foram transferidos para uma ampôla de decantação de 1 L. Foi feita uma extração líquido-líquido, usando como solvente 100 mL de acetato de etilo. Esta mistura foi fortemente agitada, procedeu-se à abertura da ampôla para libertação da pressão e foi decantada, sendo recuperada a fase orgânica. A extração foi repetida mais uma vez com igual procedimento, resultando duas fases:

- a fase orgânica, de menor densidade, designada por fração acetato de etilo (EtOAc). Foi evaporado o solvente, foi dissolvida em água e foi recolhida para porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;
- a fase aquosa, foi submetida ao evaporador até à secura.

À fase aquosa, evaporada até à secura, foram adicionados 100 mL de metanol, verificando-se uma dissolução. De seguida adicionou-se gradualmente 200 mL de acetona até provocar a precipitação. Após agitação durante 1 h a 4°C e centrifugação a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, resultou:

- a fração acetona (AcO), que foi dissolvida em água destilada, evaporada até remoção de acetona e colocada em porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;
- o sobrenadante que foi concentrado por evaporação.

Ao material resultante da evaporação do sobrenadante adicionou-se 50 mL de água destilada e gradualmente 400 mL de etanol absoluto e a solução foi agitada durante 1 h a 4°C. Após decantação e centrifugação resultou:

- a fração etanol (EtOH) suspensa em água destilada e colocada em porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;
- o sobrenadante (405 mL).

Ao sobrenadante adicionaram-se 405 mL de acetona resultando numa precipitação. Após agitação durante 1 h a 4°C e centrifugação resultou:

- a fração acetona 2 (AcO 2) suspensa em água destilada e colocada em porta-amostra de plástico, congelada e liofilizada;
- o sobrenadante de acetona (840 mL).

O sobrenadante de acetona foi evaporado e dissolvido em água, resultando na fração sobrenadante de acetona (SnAcO) (85 mL), colocada em porta-amostra de plástico e congelada. Esta fração, devido à sua higroscopicidade, foi armazenada em solução de 65 mL de água destilada e 50 mL de etanol, perfazendo um volume de 200 mL e mantida na ausência da luz e a 4°C.

Para a determinação da massa da fração SnAcO procedeu-se à concentração de uma quantidade exata (1 mL), obtendo-se 333,6 mg.

O fluxograma do processamento do vinho tinto encontra-se descrito na **Figura 4.1**.

Todas as frações foram conservadas num exsicador com pentóxido de fósforo na ausência de luz.

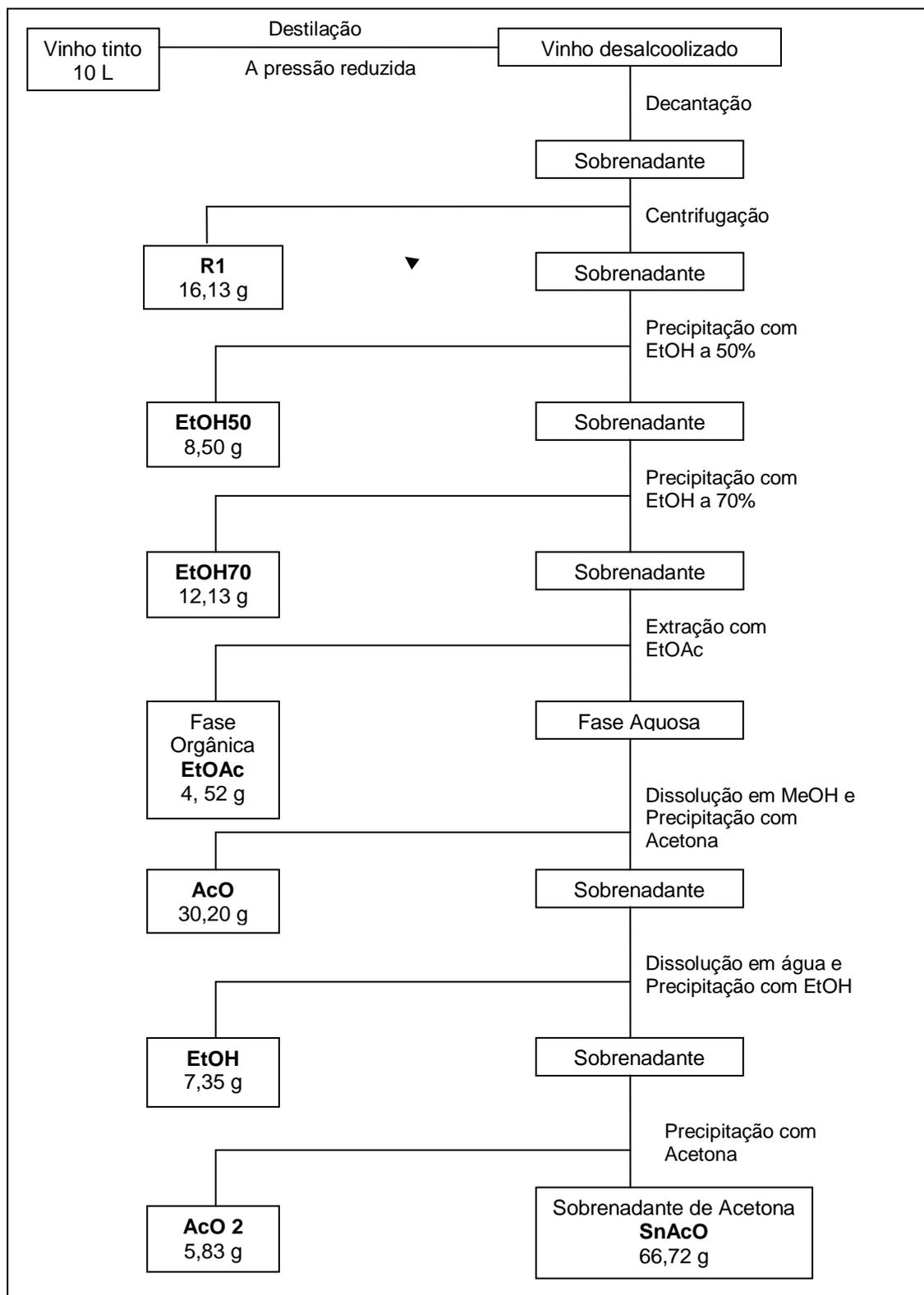


Figura 4.1 - Fluxograma do fracionamento do resíduo desalcoholizado resultante da destilação vínica.

4.3. Estudo da estabilidade das frações ao armazenamento e microencapsulamento

As frações liofilizadas resultantes do resíduo desalcoolizado da destilação vínica: R1, EtOH50, EtOH70, EtOAc, AcO, EtOH, AcO 2 e SnAcO foram conservadas num exsiccador com pentóxido de fósforo na ausência de luz durante 7 meses (FL1) e também 17 meses (FL2).

As frações liofilizadas resultantes do resíduo desalcoolizado da destilação vínica foram, também microencapsuladas, e mantidas na ausência da luz e a 4°C durante 17 meses (FLM). Devido à quantidade de amostra disponível, só foi possível obter microcápsulas das frações R1, EtOH50, EtOH70, AcO, EtOH e AcO 2.

O microencapsulamento foi realizado na Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As FLM foram obtidas a partir de uma solução contendo, capsul (70%) e gelatina (20%) como matriz e resíduo (10%) como núcleo. A gelatina e o capsul foram dissolvidos em água a uma temperatura de 35°C e acrescidos do resíduo, para facilitar a dissolução.

Foram feitos num total de 50 mL de solução para cada resíduo nas proporções 8,4 g de capsul, 2,4 g de gelatina e 1,2 g de resíduo de cada fração, totalizando 12 g de líofilo para cada.

4.4. Quantificação dos compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas frações obtidas a partir do resíduo desalcoolizado foi feita espectrofotometricamente de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo Singleton & Rossi, 1965, usando o ácido gálico e a (+)-catequina como padrões. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico e (+)-catequina (Ghiselli *et al.*, 1998; Katalinić *et al.*, 2006).

Num tubo de ensaio colocaram-se 100 μL de padrão ou amostra diluída, adicionaram-se 7,9 mL de água destilada e agitou-se. Adicionaram-se 500 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e agitou-se novamente. Finalmente adicionaram-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (preparada no dia anterior) previamente filtrada e agitou-se. A solução foi guardada no escuro durante 2 h antes da medição da absorvância a 765 nm utilizando-se cuvetes de 4 mL, tendo como branco o ar.

A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por intrapolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração:

- utilizando padrão de ácido gálico com concentrações entre 0,1-1 gL^{-1} e expresso como g de EAG (equivalentes de ácido gálico) por L;
- utilizando padrão de (+)-catequina com concentrações entre 0,0122-0,2660 gL^{-1} e expresso como g de EC (equivalentes de (+)-catequina) por L.

Todas as análises espectrofotométricas foram feitas em triplicado.

4.5. Determinação de açúcares neutros e quantificação dos ácidos urónicos

4.5.1. Hidrólise do material celular

Os polissacarídeos foram inicialmente hidrolisados pelo método de Saeman *et al.* (1963), descrito por Coimbra (1993). Pesaram-se 1-2 mg de cada fração para um tubo de cultura previamente lavado com ácido. Adicionaram-se 200 μL de H_2SO_4 a 72% e hidrolisou-se durante 3 h à temperatura ambiente com agitação ocasional.

Adicionaram-se 2,2 mL de água destilada (diluição do H_2SO_4 a 72% para 1M), agitaram-se e hidrolisaram-se durante 2 h e 30 min a 100°C. Ao fim de 1 h de hidrólise, a amostra foi arrefecida em gelo, retirando-se 0,5 mL de solução para análise dos ácidos urónicos (ver ponto 3.5.3). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

4.5.2. Análise de açúcares neutros

Os açúcares neutros foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) sob a forma volátil de acetatos de alditol. Esta transformação é fundamental, porque, caso contrário, não poderiam ser analisados por GC-FID, uma vez que não poderiam ser aquecidos a temperaturas elevadas sem caramelizarem.

Os monossacarídeos libertados pela hidrólise ácida foram transformados na sua forma volátil por redução e acetilação seguindo o método de Blakeney et al. (1983) e Harris et al. (1988), descrito por Coimbra (1993).

À solução restante de 1,9 mL referida no ponto 3.5.1, após arrefecimento em gelo, 200 μ L de solução de 2-desoxiglucose (1 g/L) foram adicionados como padrão interno.

Retirou-se 1 mL da solução para um tubo de cultura (previamente lavado com ácido) e adicionaram-se 200 μ L de solução de NH_3 a 25% para neutralização do ácido.

Os açúcares foram reduzidos a alditóis por adição de 100 μ L de solução de 15% NaBH_4 em NH_3 3M, (esta última preparada no momento) à solução neutralizada, a solução foi agitada e incubada durante 1 h a 30°C. Após arrefecimento, e com os tubos em banho de gelo, adicionou-se ácido acético glacial (2 x 50 μ L), de forma a eliminar o excesso de NaBH_4 .

A acetilação dos alditóis foi efectuada numa alíquota de 300 μ L colocada num tubo sovirel, arrefecida em gelo, por adição de 450 μ L de 1-metil-imidazol como catalizador e 3 mL de anidrido acético, tendo-se deixado reagir durante 30 min a 30°C. De seguida, e após os tubos terem sido arrefecidos, adicionaram-se 4 mL de água destilada para destruir o excesso de anidrido acético.

A extração dos acetatos de alditol foi efectuada com 2,5 mL de diclorometano. Após adição do solvente, os tubos foram tapados e agitados vigorosamente, de forma a promover a passagem dos acetatos de alditol para a fase orgânica. As fases foram separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 30 s, e a fase aquosa foi removida por aspiração. Adicionaram-se 3 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano à fase orgânica, repetindo-se o procedimento

anterior. Efectuaram-se 3 lavagens com 3 mL de água destilada, a fim de eliminar completamente o 1-metil-imidazol. Entre cada lavagem, a separação de fases e a remoção da fase aquosa foram efectuadas pelos procedimentos anteriormente descritos.

Após as lavagens, a fase orgânica final foi transferida para outro tubo limpo e seco, foi evaporada num concentrador de amostras a 40°C, sob fluxo de azoto. Adicionou-se 1 mL de acetona, por duas vezes, e evaporou-se para co-evaporar qualquer resíduo de água. As amostras foram em seguida guardadas em ambiente anidro até serem analisadas por GC-FID.

Para análise dos acetatos de alditol, as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de acetona anidra e injectadas (2 µL) no cromatógrafo de gases, equipado com: (1) uma coluna DB-225 (J. & W. Scientific, Inc.) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme, (2) um injector “split/splitless” para análise de acetatos de alditol, (3) um detector de ionização de chama (FID) e (4) o programa de aquisição e integração Varian Star Chromatography Workstation para análise de acetatos de alditol. As condições de análise foram: razão *split* 1:60; temperatura do injector e do detector a 220 e 230°C, respectivamente; o programa de temperatura do forno usado foi: 220°C durante 1 min, um incremento de 40°C min⁻¹ até 220°C e mantida durante 14 min, seguida por um incremento de 20°C min⁻¹ até 230°C e mantida durante 1 min. O caudal do gás de arraste (H₂) foi de 1 mL min⁻¹.

A identificação dos açúcares foi efectuada por comparação dos tempos de retenção com o de padrões de referência (ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose) também derivatizados a acetatos de alditol. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

4.5.3. Quantificação de ácidos urónicos

Os ácidos urónicos foram quantificados por adaptação segundo Selvendran *et al.* (1979) ao método proposto por Blumenkrantz e Asboe-Hansen, (1973), conforme descrito por Coimbra (1993).

A alíquota de 0,5 mL referida no ponto 3.5.1 foi em seguida diluída com 3 mL de água destilada, homogeneizada e se necessário congelada para análise posterior.

Para a análise de uma amostra foram utilizados 3 tubos de ensaio de dimensões próximas de 1,5 cm de diâmetro e 16 cm de altura (previamente lavados com ácido e arrefecidos em água com gelo), aos quais se adicionou individualmente 3 mL de solução de 50 mM de ácido bórico em H_2SO_4 concentrado. Em seguida, a cada um dos tubos adicionaram-se 0,5 mL de solução de amostra e, após agitação, os tubos foram aquecidos em banho de água a 100°C durante 10 min. Após o arrefecimento, a 2 de cada 3 tubos contendo a mesma amostra, adicionou-se 100 μL de solução de 3-fenilfenol (0,15% em 0,5% de NaOH), sendo deixados na ausência de luz durante 30 min para desenvolvimento de cor.

Transferiu-se o líquido para células de plástico. A absorvância foi determinada a 520 nm, tendo as soluções sido lidas contra o ar. O valor da absorvância para cada amostra foi dado pela média dos valores dos dois tubos contendo 3-fenilfenol, subtraído ao valor registado para o tubo em branco.

A acompanhar as amostras foram sempre feitos padrões de ácido galacturónico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo a quantidade de ácido urónico na amostra determinada por intrapolação gráfica, com correlação linear entre 0 e 40 $\mu\text{g/tubo}$. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

4.5.4. Padrões

O tratamento dos padrões é simultâneo e igual ao das amostras e são preparados a partir da solução mãe de ácido galacturónico à concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$).

0 µg (GalA/tubo) -----	0,500 mL água destilada
10 µg (GalA/tubo) -----	50 µL solução mãe + 0,450 mL água destilada
20 µg (GalA/tubo) -----	100 µL solução mãe + 0,400 mL água destilada
30 µg (GalA/tubo) -----	150 µL solução mãe + 0,350 mL água destilada
40 µg (GalA/tubo) -----	200 µL solução mãe + 0,300 mL água destilada

4.6. Avaliação da atividade antioxidante

O efeito antioxidante de cada fração para com o radical DPPH[•] foi estimado de acordo com o procedimento descrito pelo Brand-Williams et al., 1995 (Williams *et al.*, 1995), modificado por Sánchez-Moreno et al., 1998 (Moreno *et al.*, 1998) e modificado no nosso laboratório.

A uma alíquota de 0,1 mL de diferentes concentrações do padrão e de cada uma das frações dissolvidas em água destilada foram adicionados 3,9 mL de DPPH[•] a 0,025 g L⁻¹ em solução de metanol.

A solução de DPPH[•] foi preparada no dia e protegida da luz. A absorvância da solução foi registada durante todo o tempo de análise para testar a estabilidade do radical.

O metanol foi usado como “zero” e a solução de DPPH[•] sem adição de antioxidante foi usada como controlo, também designada por branco (Ordoudi *et al.*, 2006).

A absorvância inicial era próxima de 0,700 em todos os casos.

A redução da concentração do DPPH[•] ou decréscimo da absorvância foi determinada a 515 nm (Moreno *et al.*, 1998) para o padrão a 0 min, 1 min, de 5 e 5 min até aos 30 min e de 15 em 15 min até aos 90 min. No caso das frações, a determinação foi feita a 0 min e em intervalos de tempo de 1 h durante 9 h (Williams *et al.*, 1995; Ordoudi *et al.*, 2006). Para ambos os casos ultrapassou-se o tempo para a reação atingir o estado de equilíbrio.

O cálculo dos parâmetros cinéticos EC₅₀ e T_{EC50} foi baseado na estimativa da concentração do DPPH[•] até a reação atingir o estado de equilíbrio. Este foi definido a partir da redução da concentração do DPPH[•], solução com amostra

(ΔC) e sem amostra (ΔC_b) durante a cinética (Ordoudi *et al.*, 2006), como o intervalo de tempo durante o qual $\Delta C - \Delta C_b \leq 0,001$.

A reação cinética do padrão e das frações com DPPH• foi registada para cada concentração testada. A partir desta representação gráfica, a percentagem de DPPH• restante no estado de equilíbrio (DPPH•_{rest}) foi determinada pela fórmula (Villaño *et al.*, 2007):

$$\%DPPH^{\bullet}_{rest} = (A_f / A_0) \times 100$$

onde A_0 e A_f correspondem à absorvância de 515nm do radical no início e no estado de equilíbrio, respetivamente. O valor A_0 é referido como o controlo, isto é, na ausência de qualquer amostra pode ser usado para confirmar a estabilidade da medição do sistema (Molyneaux, 2004). O tempo no estado de equilíbrio foi usado a fim de assegurar que a reação não progredia mais (Villaño *et al.*, 2007).

As concentrações do padrão e das frações do meio reaccional contra as percentagens do DPPH• restante (%DPPH•_{rest}) ao final da reação foram representadas graficamente a fim obter o índice EC₅₀, quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH• em 50%, calculado graficamente (Moreno *et al.*, 1998) e expresso em gL⁻¹.

O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio para a concentração EC₅₀ (T_{EC50}) foi calculado, também, graficamente e expresso em minutos (Moreno *et al.*, 1998). Este parâmetro foi obtido pela representação gráfica da concentração contra o tempo do estado de equilíbrio.

Ambos os fatores são combinados para determinar o parâmetro eficiência antirradicalar (AE) pela fórmula (Moreno *et al.*, 1998):

$$AE = 1 / (EC_{50} \times TEC_{50})$$

expressa em g⁻¹Lmin⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Destilação e fracionamento do vinho tinto

O vinho tinto (10L) foi destilado a pressão reduzida num evaporador rotativo a 40°C para eliminar o etanol e concentrar os sólidos totais. O resíduo desalcoholizado concentrado a um volume de 360 mL foi depois decantado para separação do tartarato de potássio e por centrifugação foi obtida a fração de resíduo insolúvel a frio (R1). A fração R1 corresponde a 16,13 g, o que representa 10,65% do material total obtido (**Tabela 5.1**). O material polimérico presente no sobrenadante foi fracionado por precipitação em etanol em duas frações: aquela que contém o material insolúvel em 50% de etanol (EtOH50) e aquela que contém o material insolúvel em 70% de etanol (EtOH70) (Coimbra *et al.*, 2002). A fração EtOH50 corresponde a 8,50 g de material e a fração EtOH70 corresponde a 12,13 g. Estas quantidades representam 5,61 e 8,01%, respetivamente, da quantidade total de material obtido (**Tabela 5.1**). Ao sobrenadante foi feita uma extração líquido-líquido usando como solvente acetato de etilo. A fase orgânica contém 4,52 g, o que representa 2,99% do material total obtido (**Tabela 5.1**), fração EtOAc. A fase aquosa foi levada à secura e dissolvida em metanol. Por adição de acetona resultou a fração que contém o material insolúvel em acetona (AcO). A fração AcO corresponde a 30,20 g, o que representa 19,95% do material total obtido (**Tabela 5.1**). O material polimérico presente no sobrenadante foi fracionado por precipitação em etanol na fração que contém o material insolúvel em etanol (EtOH). A fração EtOH corresponde a 7,35 g, o que representa 4,86% do material total obtido (**Tabela 5.1**). O sobrenadante foi fracionado por precipitação em acetona na fração que contém o material insolúvel em acetona (AcO 2). A fração AcO 2 corresponde a 5,83 g, o que representa 3,85% do material total obtido (**Tabela 5.1**). O sobrenadante de acetona resultou na fração que contém o material solúvel em acetona (SnAcO). A fração SnAcO corresponde a 66,72 g, o que representa 44,07% do material total obtido (**Tabela 5.1**).

A massa total das frações (151,38 g) representa uma concentração de 15,14 gL⁻¹ (**Tabela 5.1**).

Verifica-se que a ordem das frações da mais abundante em massa para a menos abundante em massa é a seguinte: SnAcO > AcO > R1 > EtOH70 > EtOH50 > EtOH > AcO 2 > EtOAc.

Tabela 5.1 – Teor total das frações liofilizadas resultantes do resíduo desalcoholizado após a destilação de 10 L de vinho tinto.

Fração	Massa obtida (g)	%
R1	16,13	10,65
EtOH50	8,50	5,61
EtOH70	12,13	8,01
EtOAc	4,52	2,99
AcO	30,20	19,95
EtOH	7,35	4,86
AcO 2	5,83	3,85
SnAcO	66,72	44,07
Total	151,38	100,00

5.2. Compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor em compostos fenólicos totais nas diversas frações foram feitas duas curvas de calibração, uma usando ácido gálico e outra usando (+)-catequina utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu. Verifica-se que os valores dos coeficientes de extinção molar são, respectivamente, $1,12 \text{ cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{L}$ e $1,14 \text{ cm}^{-1} \text{g}^{-1} \text{L}$, o que mostra valores muito próximos (**Tabela 5.2**). Por isso, a expressão dos valores em equivalentes de ácido gálico ou de (+)-catequina é equivalente.

Tabela 5.2 – Resultados extraídos das curvas de calibração do ácido gálico e da (+)-catequina.

Gama de concentração testada (gL ⁻¹)	Equação da curva de calibração	R ²	Coefficiente de extinção molar (cm ⁻¹ g ⁻¹ L)
Ácido gálico (0,1-1)	Y=1,1215X+0,0106	0,999	1,12
(+)-Catequina (0,0122-0,2660)	Y=1,1444X+0,0052	0,992	1,14

Os valores da quantificação dos compostos fenólicos totais das frações obtidas a partir do resíduo desalcoholizado da destilação vínica são apresentados na **Tabela 5.3**.

Verifica-se que a ordem das frações da mais abundante em rendimento para a menos abundante em rendimento é a seguinte: EtOH > EtOAc > AcO 2 > AcO > SnAcO > EtOH70 > EtOH50 > R1, em termos de rendimento.

Também, se verifica que a ordem das frações da mais abundante em g equivalentes padrão/L de vinho para a menos abundante em g equivalentes padrão/L de vinho é a seguinte: SnAcO > AcO > EtOH > EtOAc > AcO 2 > EtOH70 > EtOH50 > R1.

O valor dos compostos fenólicos totais encontra-se abaixo das médias de valores referenciados na literatura para a fração não alcoólica do vinho tinto na ordem de 2,675 g EAG/L, mas é superior à média de valores para a fração não alcoólica do vinho branco na ordem de 0,333 g EAG/L (Katalinić *et al.*, 2004). Segundo o estudo de Ghiselli *et al.*, 1998, a concentração de compostos fenólicos totais no vinho tinto desalcoholizado é de 2,940 g EC/L. Este resultado é de esperar visto que se trata de um processo de fracionamento de vinho tinto que pode ter sofrido alterações durante a obtenção das frações e também devido ao fato deste vinho conter mistura de uvas brancas.

Tabela 5.3 – Rendimento e quantificação em compostos fenólicos totais (CFT) para as diferentes frações, valores expressos como médias (CV), (n = 3).

Frações	% CFT (ácido gálico)	g EAG/L vinho	% CFT [[+]-catequina]	g EC/L vinho
R1	0,79 (9)	0,013 (9)	0,82 (8)	0,013 (8)
EtOH50	1,92 (1)	0,016 (1)	1,92 (1)	0,016 (1)
EtOH70	2,85 (1)	0,035 (1)	2,52 (10)	0,031 (10)
EtOAc	9,70 (1)	0,044 (1)	12,40 (2)	0,056 (2)
AcO	6,05 (0)	0,183 (0)	6,03 (1)	0,182 (1)
EtOH	13,38 (0)	0,098 (0)	14,70 (1)	0,108 (1)
AcO 2	6,74 (1)	0,039 (1)	6,66 (3)	0,039 (3)
SnAcO	4,05 (1)	0,270 (1)	3,99 (1)	0,266 (1)
Total		0,689		0,711

A **Tabela 5.4** compila os valores dos compostos fenólicos totais referentes ao vinho, referenciados na literatura, verificando-se que são superiores ao do vinho desalcoholizado segundo a literatura citada anteriormente. Igualmente conclui-se que os valores dos compostos fenólicos totais relativos ao vinho tinto são superiores ao vinho rosé e este superior ao vinho branco.

Tabela 5.4 – Valores publicados de compostos fenólicos totais para o vinho, usando o método de Folin-Ciocalteu.

Vinho tinto		Vinho branco	Vinho rosé	Referência bibliográfica
g EAG/L	g EC/L	g EAG/L	g EAG/L	
	3,250			Ghiselli <i>et al.</i> , 1998
1,262 - 2,389		0,200 - 0,400		Pachón <i>et al.</i> , 2004
1,877 ^a		0,256 ^a		
1,800 - 4,059		0,165 - 0,331		Frankel <i>et al.</i> , 1995
2,567 ^a		0,239 ^a		
2,300 - 2,704				Vaquero <i>et al.</i> , 2007
2,625 - 3,665				Radovanović <i>et al.</i> , 2009
3,442 ^a				
2,809 - 3,183				Katalinić <i>et al.</i> , 2004
4,576 - 3,183				Piljac <i>et al.</i> , 2005
0,874 - 2,262				Stratil, <i>et al.</i> , 2008
1,018 - 3,545				Landroult <i>et al.</i> , 2001
1,217 - 3,722				Arnous, <i>et al.</i> , 2002
1,710 - 2,825				Roussis <i>et al.</i> , 2005
1,810 - 2,151				Sato <i>et al.</i> , 1996
2,200 - 3,200				Tarko <i>et al.</i> , 2008
1,010 - 2,446				Moreno <i>et al.</i> , 1999
1,738 - 3,292				Villano <i>et al.</i> , 2006
1,637 - 2,717				Kösmerl e Cigić, 2008
1,615 - 2,133		0,216 - 0,353		Minussi <i>et al.</i> , 2003
1,920 ^a		0,293 ^a		
3,314 - 4,177		0,439 - 0,854	1,304	
3,760 ^a		0,634 ^a		

a – valor médio

5.3. Polissacarídeos (açúcares neutros e ácidos urónicos)

A quantificação do ácido urónico foi determinada através da equação dada pela curva de calibração, $y = 0,0068 x + 0,003$, com uma correlação linear (R^2) igual a 0,998.

A **Tabela 5.5** mostra a composição dos açúcares dos materiais poliméricos das diferentes frações liofilizadas (FL1) resultantes do resíduo desalcoholizado da destilação vínica.

Os principais açúcares presentes são o ácido urónico (UA) – nome experimental dado aos resíduos de ácido galacturónico dos polissacarídeos pécticos, glucose (Glc), manose (Man), arabinose (Ara), galactose (Gal), ramnose (Rha) e xilose (Xyl). A fração R1 é rica em UA. A fração EtOH50 é rica em UA e Man. A fração EtOH70 é rica em UA e Gal, Man e Glc quantidades semelhantes. A fração EtOAc é rica em UA. A fração AcO é rica em UA e Glc. A fração EtOH é rica em UA e Glc. A fração AcO 2 é rica em UA e Glc. A fração SnAcO é rica em Glc, UA.

Verifica-se que a ordem das frações da mais abundante em açúcares totais, expressos em mg/g de extrato para a menos abundante em açúcares totais, expressos em mg/g de extrato é a seguinte: EtOH70 > EtOH50 > AcO > AcO 2 > EtOH > R1 > SnAcO > EtOAc.

A fração EtOH70 é a mais rica em açúcares (45,5%), seguida da fração EtOH50 com 39,7% de açúcares. Pela bibliografia, os açúcares que precipitam em EtOH são polissacarídeos. A fração EtOH70 é rica em UA e possui também Gal, Ara e Rha, que são açúcares constituintes dos polissacarídeos pécticos. A fração EtOH50 também é rica em UA e possui elevadas quantidades de Man. Esta fração corresponde possivelmente a manoproteínas (Coelho *et al.*, 2011).

Todas as frações são compostas por açúcares, para além dos compostos fenólicos, como se mostra no capítulo anterior. Como estes açúcares não precipitam em etanol é possível que este material não corresponda a polissacarídeos.

Tabela 5.5 – Rendimento e composição em açúcares das frações liofilizadas (FL1) de polissacarídeos do resíduo desalcoolidado, valores expressos como médias (CV), (n = 6).

Fração	R (%w/w)	(mg/g extrato)								Açúcares totais* (mg/g)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	UA	
R1	10,65	1(1)	0	1 (6)	0	4 (4)	1 (5)	6 (2)	83 (4)	97 (3)
EtOH50	5,61	10 (7)	0	20 (7)	2 (2)	107 (11)	34 (7)	39 (6)	185 (17)	397 (11)
EtOH70	8,01	11 (7)	0	28 (11)	4 (7)	41 (9)	45 (8)	38 (8)	287 (11)	455 (5)
EtOAc	2,99	3 (1)	0	1 (51)	0	0	0	6 (4)	75 (20)	85 (18)
ACO	19,95	4 (16)	0	24 (27)	8 (5)	19 (2)	12 (5)	75 (19)	146 (29)	289 (22)
EtOH	4,86	3 (3)	0	7 (1)	6 (4)	9 (2)	7 (4)	62 (1)	114 (15)	208 (8)
AcO 2	3,85	2 (2)	0	9 (18)	7(9)	14(5)	7 (6)	79 (25)	124 (19)	242 (18)
SnAcO	44,07	2 (2)	0 (2)	9 (5)	2 (4)	7 (1)	4 (5)	42 (3)	19 (4)	86 (3)

* Valores expressos em mg de açúcar anidro por g

Quer os açúcares quer os compostos fenólicos estão descritos como tendo atividade antioxidante, que vão ser discutidos a seguir.

5.4. Avaliação da atividade antioxidante

O modelo de eliminação do radical estável DPPH é o método usado para avaliar a atividade antioxidante num tempo curto. A adição de frações à solução de DPPH[•] causa um rápido decréscimo na absorvância a 515 nm. Os graus de descoloração indicam a capacidade de eliminação de radicais livres das frações. O efeito do antioxidante na eliminação do DPPH[•] foi atribuído à sua capacidade de ceder hidrogénios ou atividade de eliminação de radicais. Os antioxidantes cessam a cadeia de oxidação dos radicais livres e doam hidrogénio dos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos. Consequentemente formam produtos finais estáveis.

Foram preparadas cinco concentrações diferentes do radical DPPH[•], compreendidas entre 0,025 e 0,005 gL⁻¹ para estabelecer relação entre a concentração do radical e a absorvância (curva de calibração do DPPH[•]).

A concentração inicial exata do DPPH[•] no meio reacional a diferentes intervalos de tempo (t) ([DPPH[•]]_t) foi calculada a partir da equação (regressão linear) dada pela curva de calibração (**Figura 5.1**):

$$A_{515\text{nm}} = 27,38 [\text{DPPH}^{\bullet}]_t + 0,013,$$

onde [DPPH[•]]_t foi expresso em gL⁻¹ com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,999.

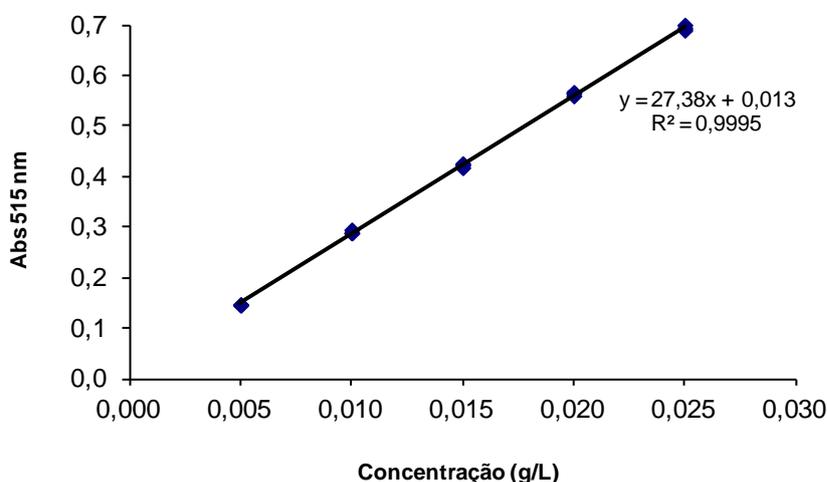


Figura 5.1 - Curva de calibração para o DPPH[•].

Como o coeficiente de extinção molar do DPPH[•] depende do solvente, foi estimado sob as nossas condições de trabalho. Resultou num $\epsilon = 27,38 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o mesmo que [DPPH[•]]_t for expresso em molL⁻¹ e $\epsilon = 1,08 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, valor que se verifica na literatura situado entre $1,09 - 1,25 \times 10^4$ (Molyneux, 2004) e $1,16 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Villaño *et al.*, 2007).

Analisando a curva de calibração observa-se que há uma linearidade na gama de concentrações de DPPH[•], havendo proporcionalidade entre a concentração e a absorvância. Como todas as concentrações foram feitas a partir

da solução mais concentrada, apenas nesta foi necessário pesar a massa de DPPH•, reduzindo o erro devido a perdas de massa.

5.4.1. Padrão: ácido gálico

Foram preparadas seis concentrações diferentes do padrão, compreendidas entre 0,085 e 0,017 gL⁻¹, e os seus valores referenciados ao volume de 4 mL da cuvete, correspondem ao intervalo de 0,00213 a 0,00043 gL⁻¹ e estudadas a fim de verificar a linearidade de resposta e de estabelecer os valores da atividade antioxidante numa adequada escala linear.

Os antioxidantes fenólicos (PheOH) são radicais livres terminadores. Esta atividade depende principalmente das diferentes características estruturais tal como a energia de dissociação das ligações O-H, deslocalização da ressonância do radical fenólico (PheO•) e obstáculos estéreos derivados de grandes grupos substituintes de hidrogénio no anel aromático. Os rácios constantes da reação dos PheOH com os radicais livres indicarão a ordem de reatividade (Moreno *et al.*, 1998).

A principal reação pode ser:



onde (I), (II), (III), ... são estruturas de ressonância (Moreno *et al.*, 1998).

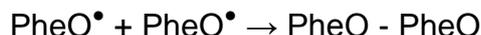
A concentração residual de DPPH• dependerá em exclusivo da concentração e estrutura do composto fenólico, porque há duas reacções teóricas de terminação:



(não é permitida devido ao impedimento estereoquímico);



(pode ocorrer em alguns casos, mas também pode não ser permitida em função do PheOH molecular e dos volumes substituintes no anel benzénico). Complementará com PheO• o acoplamento da reação de terminação (Moreno *et al.*, 1998):



O nitrogénio centrado nos radicais, tal como no DPPH• reage com os fenóis por via de dois mecanismos diferentes: abstracção direta (doação) do átomo de H do fenol e processo de transferência (deslocalização) do electrão do fenol ou anião fenóxido para o DPPH•. A contribuição de um ou outro depende da natureza do solvente e/ou do potencial redox das espécies envolvidas. Para solventes apolares o primeiro mecanismo é predominante, mas para solventes polares, caso do metanol, capaz de formar fortes ligações de H com a molécula de fenol, o segundo mecanismo torna-se importante (Villaño *et al.*, 2007).

Podemos observar através da representação gráfica (**Figura 5.2**), tempo *versus* absorvância uma reação bifásica (curva hiperbólica) com um rápido decréscimo inicial da absorvância seguida por um lento subsequente desaparecimento do DPPH•. Este fato é atribuído às reações descritas acima por Moreno *et al.* (1998) (Villaño *et al.*, 2007).

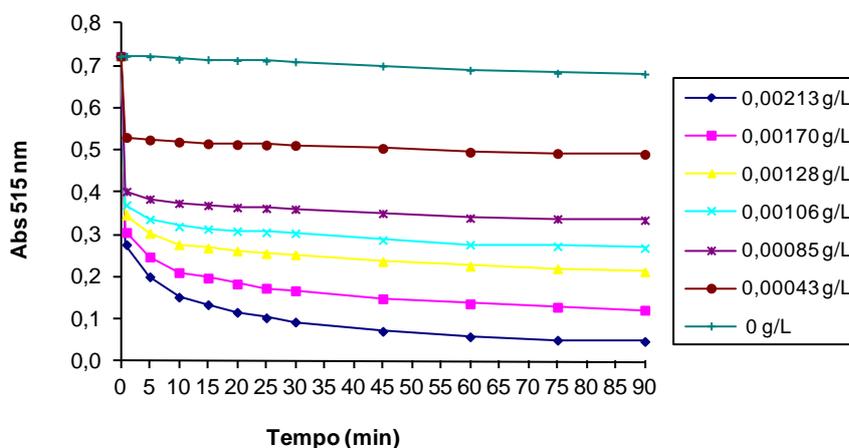


Figura 5.2 - Curvas de reação entre o DPPH• e as diferentes soluções de padrão.

O comportamento cinético obtido a partir das diferentes concentrações testadas (**Tabela 5.6**) mostra que para concentrações mais elevadas, menores $\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rest}}$, como verificado por Moreno *et al.* (1998).

Tabela 5.6 - $\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rest}}$ no estado de equilíbrio para as diferentes concentrações do padrão.

Concentração (mg ml ⁻¹)	0,00213	0,00170	0,00128	0,00106	0,00085	0,00043
% $\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rest}}$	7,05	17,84	31,26	42,05	49,93	71,09

A concentração contra a percentagem do $\text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rest}}$ foi representada graficamente (**Figura 5.3**) para obter a quantidade do padrão necessária para diminuir em 50% a concentração inicial do DPPH^{\bullet} (EC_{50}), através do modelo da equação dada pela curva de calibração:

$$\% \text{DPPH}^{\bullet}_{\text{rest}} = -37521 [\text{EC}_{50}] + 83,086$$

onde $[\text{EC}_{50}]$ foi expressa em gL^{-1} com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,981 e um desvio = -37521, o qual pode ser usado como parâmetro para comparar o comportamento cinético de diferentes padrões para a mesma concentração.

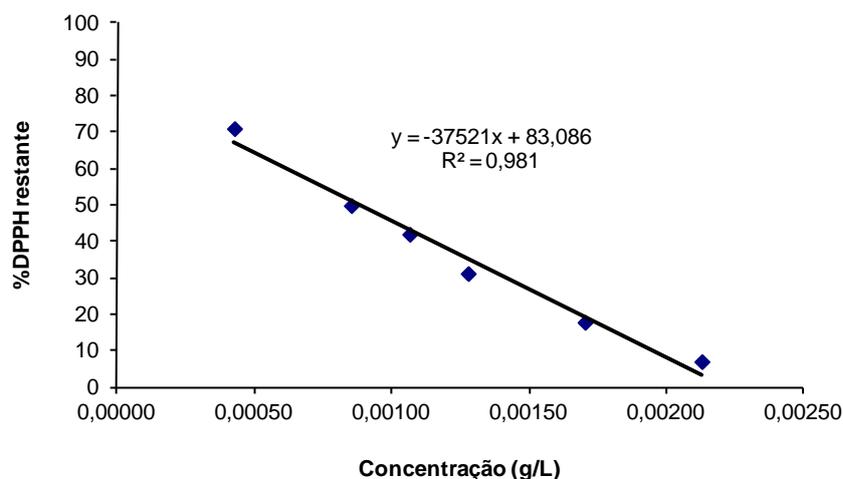


Figura 5.3 - Gráfico da variação de %DPPH_{restante} em função da concentração de ácido gálico, que permitem o cálculo do valor EC₅₀ do padrão em relação ao radical livre DPPH[•].

O EC₅₀ é inversamente proporcional à capacidade antioxidante do composto, logo um menor EC₅₀, um maior poder antirradicalar ($1/EC_{50}$).

Ao substituírmos a %DPPH[•]_{rest} por 50, o valor EC₅₀ encontrado para o padrão foi de $8,82 \times 10^{-4} \text{ gL}^{-1}$ (**Tabela 5.8**) e está de acordo com $8,68 \times 10^{-4} \text{ gL}^{-1}$ (Villaño *et al.*, 2007); $4,2 \times 10^{-4} \text{ gL}^{-1}$ (Williams *et al.*, 1995), $3,2 \times 10^{-4} \text{ gL}^{-1}$ (Moreno *et al.*, 1998; Larrauri *et al.*, 1999) expressos por modelos exponenciais diferentes, o que sugere um comportamento diferente de eliminação de radicais livres.

A classificação cinética do padrão baseada no tempo para atingir o estado de equilíbrio e considerando que depende da concentração e reatividade dos antioxidantes (Villaño *et al.*, 2007) é definido pelo parâmetro: T_{EC50}, que foi obtido pela representação gráfica das concentrações contra os tempos do estado de equilíbrio (**Figura 5.4**).

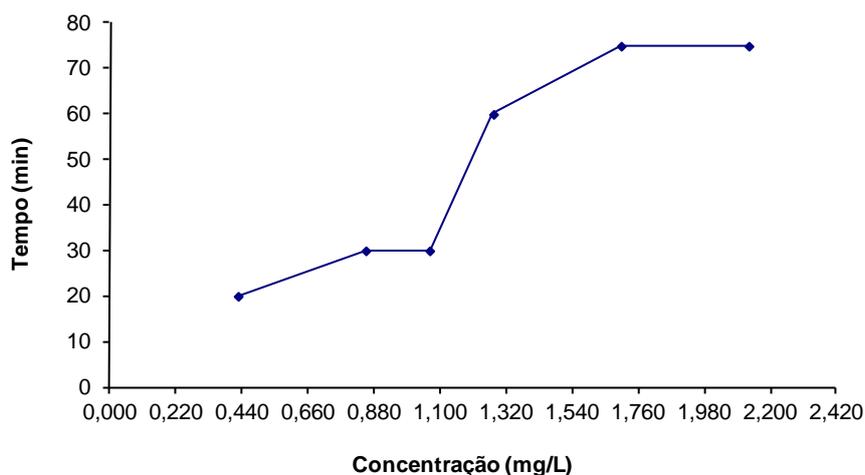


Figura 5.4 - Tempo necessário para se atingir o EC_{50} para diferentes concentrações de DPPH, que permite o cálculo do valor $T_{EC_{50}}$ do padrão.

O valor $T_{EC_{50}}$ encontrado para o padrão foi de 30 min (**Tabela 5.8**), o que se traduz num comportamento cinético de classificação intermédio-lento. O valor reportado por Moreno *et al.* (1998) foi de 14,69 min e uma classificação intermédia, por Villaño *et al.* (2007) foi de 53 min e uma classificação lenta.

Há pouca informação no comportamento cinético dos antioxidantes no processo de oxidação. O poder antioxidante resulta, primeiro da capacidade de prevenção da auto-oxidação dos radicais livres mediadores da oxidação dos substratos a baixa concentração e segundo, que o radical resultante após a eliminação deve ser estável. Tempos baixos devem ser adicionados à primeira condição, resultando baixas concentrações e tempos baixos, porque o tempo de reação é importante para definir a atividade antioxidante. (Moreno *et al.*, 1998).

Assim, é proposto um novo parâmetro: eficiência antirradicalar (AE), o qual envolve o poder antirradicalar ($1/EC_{50}$) e o tempo de reação ($T_{EC_{50}}$); AE é mais adequada na selecção dos compostos antioxidantes. Um menor EC_{50} , um menor $T_{EC_{50}}$ e uma maior AE (Moreno *et al.*, 1998).

O método DPPH permite avaliar as propriedades dadoras do eletrão ou do átomo de H dos antioxidantes e também, a sua taxa de reação para o radical livre. O parâmetro AE compreende estes dois aspectos no sentido de caracterizar

facilmente o comportamento de uma substância como antioxidante. Esta característica é de grande importância nos sistemas biológicos, porque os radicais livres têm um período de vida curto. (Villaño *et al.*, 2007).

O valor AE encontrado para o padrão foi $37,80 \text{ g}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$. A literatura reporta $21,74 \text{ g}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$ (Villaño *et al.*, 2007); $212,73 \text{ g}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$ (Moreno *et al.*, 1998; Larrauri *et al.*, 1999).

5.4.2. Frações ao fim de 7 (FL1) e 17 meses (FL2) de armazenamento

A **Tabela 5.7** mostra os intervalos das concentrações de cada uma das oito frações obtidas a partir do vinho de modo a que, quando adicionadas ao volume de DPPH usado, permitissem calcular o valor de EC_{50} . Os ensaios referem-se a um tempo de armazenamento de 7 meses (FL1) e de 17 meses (FL2).

Foram preparadas cinco concentrações diferentes de cada uma das oito frações, compreendidas em intervalos distintos (**Tabela 5.7**).

Tabela 5.7 - Intervalos das concentrações das frações (FL1 e FL2) preparadas, expressas em gL^{-1} vinho.

Frações		Concentração
		gL^{-1}
R1	FL1	15,81 – 3,16
	FL2	18,28 – 2,29
EtOH50	FL1	9,02 – 1,80
	FL2	8,99 – 1,80
EtOH70	FL1	4,01 – 0,80
	FL2	4,06 – 0,81
EtOAc	FL1	1,62 – 0,32
	FL2	1,65 – 0,33
AcO	FL1	2,22 – 0,44
	FL2	2,24 – 0,45
EtOH	FL1	1,04 – 0,21
	FL2	1,07 - 0,21
ACO 2	FL1	1,86 – 0,37
	FL2	2,01 – 0,40
SnAcO	FL1	3,34 – 0,67
	FL2	3,34 – 0,67

Todas as frações testadas apresentaram uma reação bifásica, com um rápido decréscimo na absorvância nos primeiros minutos, seguida de uma fase mais lenta de degradação até o estado de equilíbrio ser atingido, como se exemplifica nas **Figura 5.5** e **Figura 5.6** para a fração AcO2 ao fim de 7 e 17 meses de armazenamento, respetivamente.

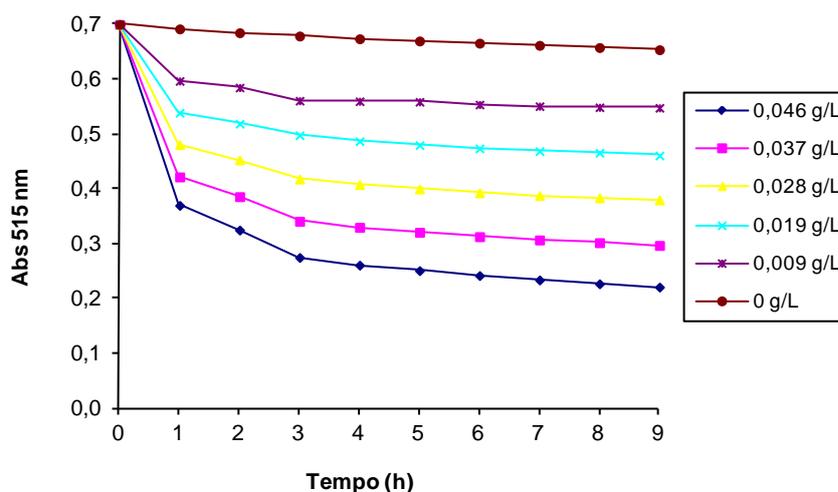


Figura 5.5 - Curvas de reação entre DPPH• e diferentes soluções da fração AcO 2 - FL1.

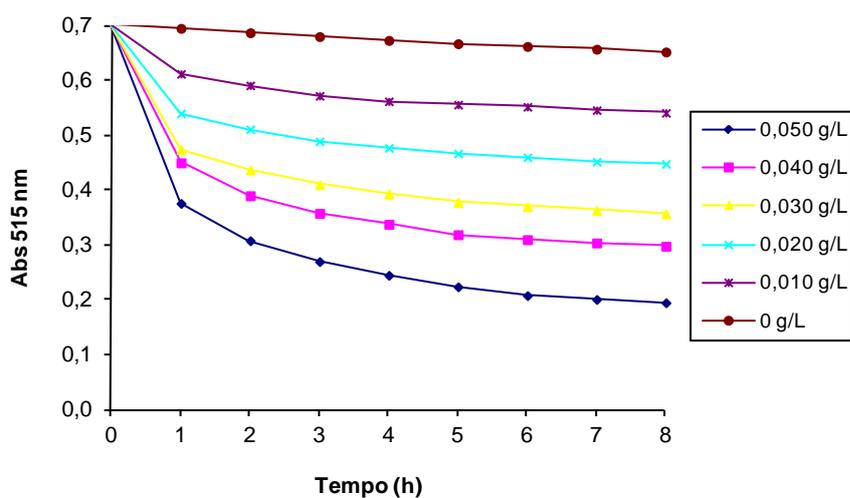


Figura 5.6 - Curvas de reação entre DPPH• e diferentes soluções da fração AcO 2 - FL2.

Os parâmetros EC_{50} calculados para estas duas frações são mostrados nas **Figura 5.7** e **Figura 5.8**. Os valores EC_{50} calculados para todas as frações estão na **Tabela 5.8**.

O poder antirradicalar ($1/EC_{50}$), calculado como o inverso do parâmetro EC_{50} , tem a seguinte ordem: EtOH > EtOAc > AcO 2 > AcO > SnAcO > EtOH70 > EtOH50 > R1, independentemente do tempo de armazenamento.

Os valores de EC_{50} aumentam com o tempo de prateleira, FL1 para FL2, variando na ordem dos 1,8% no caso da fração SnAcO, 2,3% para a fração EtOH50, 3,1% para a fração AcO 2, 4,2% para a fração EtOH70, 5,1% para a fração AcO, 7,1% para a fração EtOAc, 15,4% para a fração EtOH e 83,4% para a fração R1.

Estes resultados mostram que o tempo de prateleira faz diminuir o poder antirradicalar das frações, tendo mais efeito – a fração R1, que é a fração com menor poder antioxidante. Das frações com maior poder antioxidante, ou seja, todas as restantes frações, exceto para a de EtOH, a perda de atividade antirradicalar pelo armazenamento, é relativamente pequeno (1,8 a 7,1%), o que mostra que estes compostos mantêm a sua atividade mesmo após 17 meses de armazenamento.

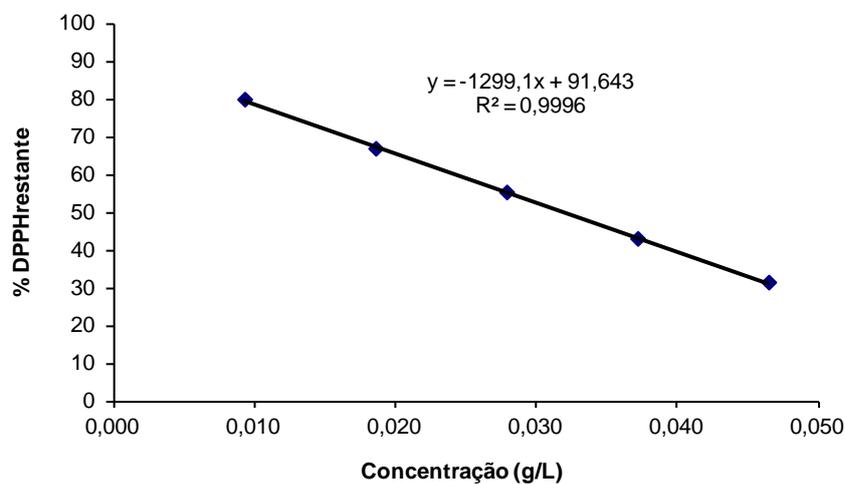


Figura 5.7 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 - FL1, que permite o cálculo do valor EC_{50} da fração AcO 2 - FL1.

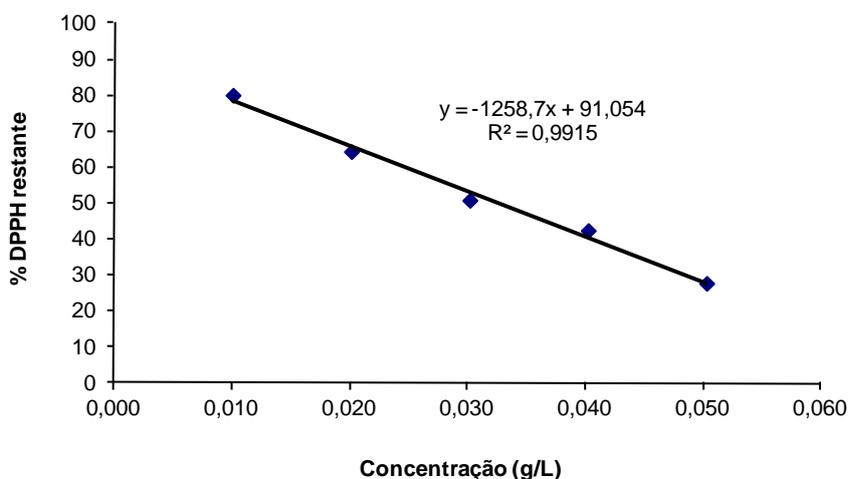


Figura 5.8 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 – FL2, que permite o cálculo do valor EC_{50} da fração AcO 2 – FL2.

Os valores encontrados para o parâmetro T_{EC50} correspondentes às frações testadas FL1 variam desde os 360 aos 454 min e FL2 desde os 402 aos 480 min, o que se traduz em comportamentos cinéticos muito lentos (**Tabela 5.8**). Estas cinéticas lentas representam todas curvas hiperbólicas a partir de 1 h a 6 h para atingir o estado de equilíbrio (Williams *et al.*, 1995). À medida que o tempo de prateleira aumenta, de FL1 para FL2, verifica-se um aumento de tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio. Por exemplo, para a fração AcO 2, o estado de equilíbrio é atingido aos 447 min (FL1) e 480 min (FL2). Verifica-se que os menores tempos para atingir o estado de equilíbrio para FL1, FL2 são na fração EtOH; os maiores tempos para FL1, FL2 são respetivamente na fração AcO e AcO 2.

O parâmetro T_{EC50} calculado é exemplificado nas **Figura 5.9** e **Figura 5.10**, para a fração de AcO 2. Os valores T_{EC50} não são muito diferentes para as diferentes frações (**Tabela 5.8**). As frações FL2 necessitam de mais um pouco de tempo para atingir o EC_{50} do que as frações FL1.

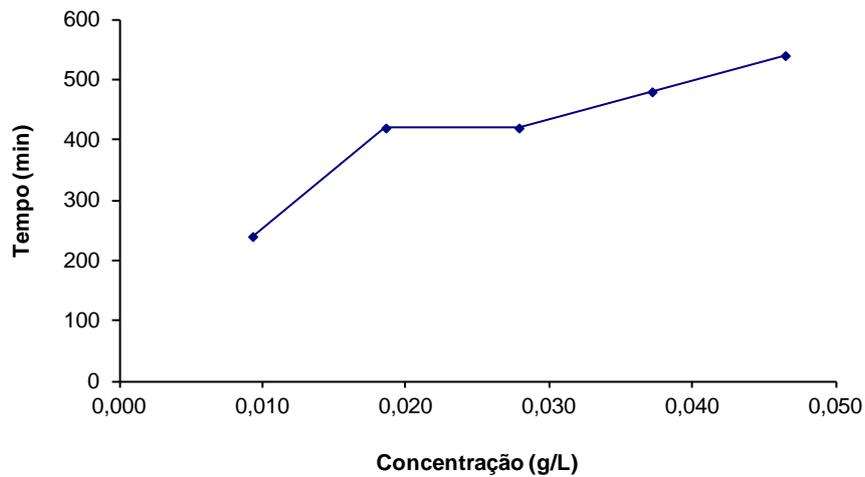


Figura 5.9 - Tempo necessário para se atingir o EC₅₀ para diferentes concentrações da fração AcO 2 - FL1, que permite o cálculo do valor T_{EC50} da fração AcO 2 - FL1.

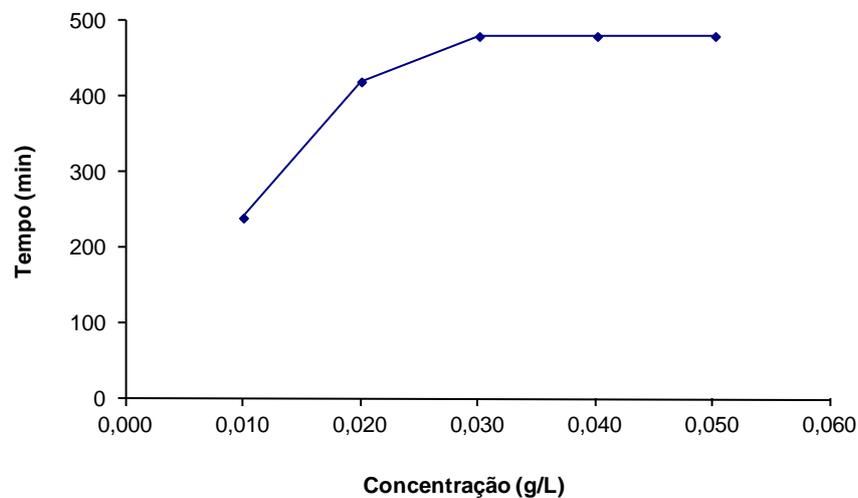


Figura 5.10 - Tempo necessário para se atingir o EC₅₀ para diferentes concentrações da fração AcO 2 - FL2, que permite o cálculo do valor T_{EC50} da fração AcO 2 - FL2.

O valor da AE é o resultado de uma combinação de cinética e o aproximar estático para caracterizar a eficiência antioxidante de uma molécula. Este parâmetro fornece uma média indireta considerando que baixos T_{EC50} e baixas

quantidades de poder antioxidante são necessários para prevenir a auto-oxidação de radicais livres mediante a oxidação de um substrato lipídico (Ordoudi *et al.*, 2006).

O parâmetro AE, definido como a eficiência antirradicalar, é o fator que combina o EC_{50} e o T_{EC50} . Compostos com um valor de EC_{50} elevado, poderão ser considerados como antioxidantes de baixa relevância, se tiverem T_{EC50} elevados. No entanto, se possuírem um valor de T_{EC50} baixo devido à taxa de reação rápida são considerados como possuindo eficiência antirradicalar elevada. Esta característica é de grande importância nos sistemas biológicos porque os radicais livres têm um tempo de vida muito curto (Villaño *et al.*, 2007).

A AE das frações testadas, quer para FL1 e FL2, segue a seguinte ordem: EtOH > EtOAc > AcO 2 > AcO > SnAcO > EtOH70 > R1 > EtOH50. Observa-se que em FL2 a ordem para as frações R1 e EtOH50 inverte-se, assim EtOH50 > R1.

Os valores de AE diminuem com o tempo de prateleira, FL1 para FL2, variando na ordem dos 3,6% para a fração AcO, 6,5% para a fração EOH70, 7,1% para a fração EtOH50, 8,6% para a fração AcO 2, 8,9% para a fração EtOAc, 9,3% para a fração SnAcO, 19,7% para a fração EtOH e 53,3% para a fração R1.

Os valores obtidos para os parâmetros da eliminação do radical livre para as frações testadas FL1, FL2 e o padrão estão resumidos na **Tabela 5.8**.

Os tempos de estado de equilíbrio dos vinhos correspondentes às concentrações EC_{50} (T_{EC50}) estão entre 25 e 40 minutos, e podem ser classificadas de “lentas” tendo em conta uma precedente classificação cinética (Laurrari *et al.*, 1999).

Os vinhos novos apresentam valores EC_{50} na ordem dos $0,01536 \text{ gL}^{-1}$, T_{EC50} de 31 min e AE de $2,1 \text{ g}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$; enquanto que os vinhos envelhecidos apresentam valores EC_{50} na ordem dos $0,01414 \text{ gL}^{-1}$, T_{EC50} de 30 min e AE de $2,4 \text{ g}^{-1}\text{Lmin}^{-1}$ (Laurrari *et al.*, 1999).

Tabela 5.8 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH* das frações FL1 e FL2 e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).

Frações Padrão	EC ₅₀	Desvio	Coeficientes de correlação	Intervalos de tempo no estado de equilíbrio	T _{EC50}	Classificação	AE	Classificação	
									gL ⁻¹
R1	FL1	0,181 (1)	-169,15	0,979	300-400	378	Muito lenta	0,015	Baixa
	FL2	0,332 (1)	-127,51	0,993	240-480	458	Muito lenta	0,007	Baixa
EtOH50	FL1	0,174 (2)	-231,73	0,992	240-420	420	Muito lenta	0,014	Baixa
	FL2	0,178 (3)	-225,32	0,998	120-420	420	Muito lenta	0,013	Baixa
EtOH70	FL1	0,071 (1)	-548,12	0,993	360-480	452	Muito lenta	0,031	Baixa
	FL2	0,074 (3)	-488,4	0,995	240-480	458	Muito lenta	0,029	Baixa
EtOAc	FL1	0,028 (4)	-1498,5	0,995	240-480	449	Muito lenta	0,079	Baixa
	FL2	0,030 (3)	-1635,2	0,998	240-480	460	Muito lenta	0,072	Baixa
AcO	FL1	0,039 (3)	-1032,7	0,997	300-540	454	Muito lenta	0,056	Baixa
	FL2	0,041 (2)	-1030,2	0,997	240-480	457	Muito lenta	0,054	Baixa
EtOH	FL1	0,013 (4)	-2941,7	0,988	240-480	360	Muito lenta	0,213	Baixa
	FL2	0,015 (3)	-2835,7	0,999	240-480	402	Muito lenta	0,171	Baixa
AcO 2	FL1	0,032 (3)	-1299,1	0,999	240-540	447	Muito lenta	0,070	Baixa
	FL2	0,033 (3)	-1258,7	0,992	240-480	480	Muito lenta	0,064	Baixa
SnAcO	FL1	0,056 (2)	-752,83	0,998	240-540	420	Muito lenta	0,043	Baixa
	FL2	0,057 (2)	-712,25	0,987	240-480	446	Muito lenta	0,039	Baixa
Ácido Gálico	0,000882 (1)	-37521	0,981	20-75	30	Intermedia- lenta	37,80	Baixa	

5.4.3. Frações microencapsuladas e analisadas ao fim de 17 meses de armazenamento (FLM)

A **Tabela 5.9** mostra os intervalos das concentrações de cada uma das cinco frações microencapsuladas obtidas a partir do vinho de modo a que, quando adicionadas ao volume de DPPH usado, permitissem calcular o valor de EC₅₀. Os ensaios referem-se a um tempo de armazenamento de 17 meses (FLM).

Foram preparadas cinco concentrações diferentes de cada uma das frações, compreendidas em intervalos distintos (**Tabela 5.9**).

Tabela 5.9 - Intervalos das concentrações das frações (FLM) preparadas, expressas em gL^{-1} vinho.

Frações	Concentração
	gL^{-1}
EtOH50	7,98 – 1,00
EtOH70	4,19 – 0,79
AcO	2,23 – 0,81
EtOH	0,99 – 0,36
ACO 2	1,98 – 0,47

Todas as frações testadas apresentaram uma reação bifásica, com um rápido decréscimo na absorvância nos primeiros minutos durante a primeira hora, seguida de uma fase mais lenta de degradação até o estado de equilíbrio ser atingido, como se exemplifica na **Figura 5.11** para a fração microencapsulada AcO2 ao fim 17 meses de armazenamento.

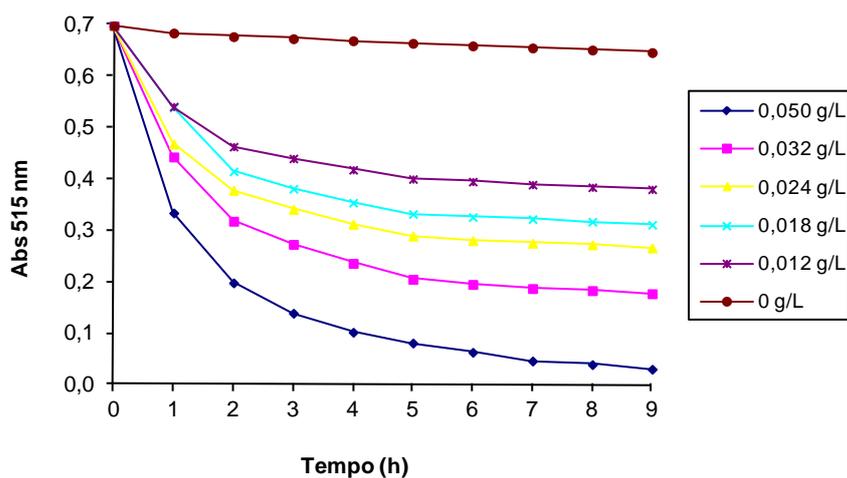


Figura 5.11 - Curvas de reação entre DPPH[•] e diferentes soluções da fração AcO 2 – FLM.

O parâmetro EC_{50} calculado para esta fração é mostrado na **Figura 5.12**. Os valores de EC_{50} calculados para todas as frações estão na **Tabela 5.10**.

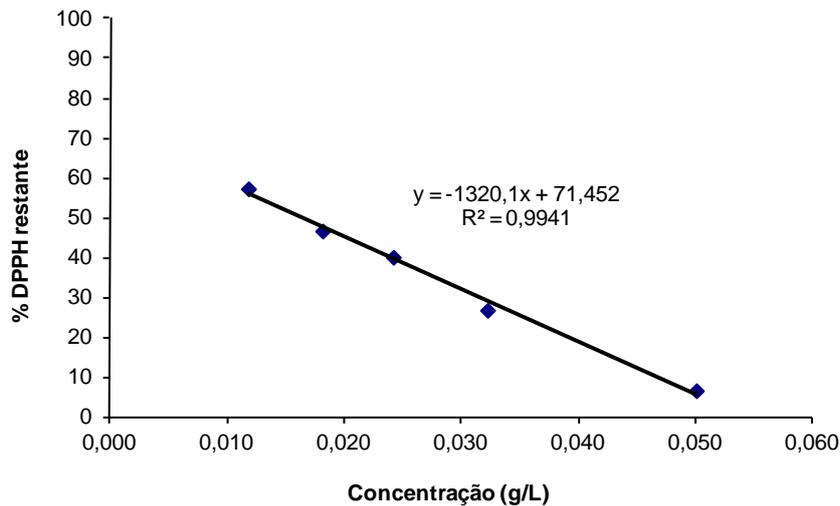


Figura 5.12 - Gráfico da variação da %DPPH restante em função da concentração da fração AcO 2 – FLM, que permite o cálculo do valor EC_{50} da fração AcO 2 – FLM.

O poder antirradicalar ($1/EC_{50}$), calculado como o inverso do parâmetro EC_{50} , tem a seguinte ordem: EtOH > AcO 2 > AcO > EtOH70 > EtOH50, o que está de acordo com o observado para as frações não encapsuladas.

Os valores de EC_{50} diminuem com o processo de preservação por microencapsulamento, FL2 para FLM, na ordem dos 62,16% para a fração EtOH70, 53,37% para a fração EtOH50, 51,51% para a fração AcO 2, 41,46% para a fração AcO e 13,33% para a fração EtOH.

Mesmo considerando as amostras analisadas ao fim de 7 meses (FL1) se verifica preservação pelo microencapsulamento. Os valores de EC_{50} diminuem com o processo de preservação por microencapsulamento, FL1 para FLM, na ordem dos 60,6% para a fração EtOH70, 52,3% para a fração EtOH50, 50% para a fração AcO 2, 38,5% para a fração AcO e sem variação para a fração EtOH.

Estes resultados mostram que a preservação por microencapsulamento, com um tempo de prateleira de 17 meses, assegurou o poder antirradicalar destas frações.

O parâmetro T_{EC50} calculado é exemplificado na **Figura 5.13**, para a fração AcO 2.

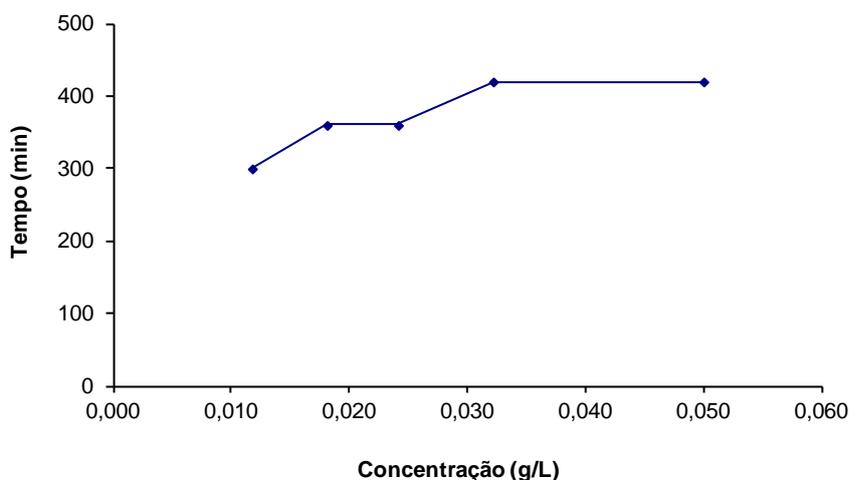


Figura 5.13 - Tempo necessário para se atingir o EC_{50} para diferentes concentrações da fração AcO 2 – FLM, que permite o cálculo do valor T_{EC50} da fração AcO 2 - FLM.

Os valores encontrados para o parâmetro T_{EC50} correspondentes às frações FLM variam desde os 276 aos 350 min, o que se traduz em comportamentos cinéticos lentos (**Tabela 5.10**). Estas cinéticas lentas representam todas curvas hiperbólicas a partir de 1 h a 6 h para atingir o estado de equilíbrio, tal como verificado por Williams *et al.*, (1995). A preservação por microencapsulamento reduz o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio. Por exemplo, para a fração AcO 2, o estado de equilíbrio é atingido aos 342 min (FLM) que é um tempo muito inferior ao verificado para esta fração ao fim de 7 meses de armazenamento (447 min) e 17 meses (480 min). Comparando o T_{EC50} de todas as frações, verifica-se que o menor tempo para atingir o estado de equilíbrio é para a fração AcO (276 min) e o maior tempo para a fração EtOH (350

min) (**Tabela 5.10**). Estes resultados mostram que os valores T_{EC50} não são muito diferentes para as diferentes frações.

A AE das frações testadas para as amostras microencapsuladas (FLM) segue a seguinte ordem: EtOH > AcO 2 > AcO > EtOH70 > EtOH50, o que está de acordo com o verificado para as amostras não microencapsuladas.

As amostras preservadas por microencapsulamento apresentam valores AE mais elevados do que para as amostras não microencapsuladas, FL2 para FLM, na ordem dos 28,07% para a fração EtOH, 174,07% para a fração AcO, 176,92% para a fração EtOH50, 181,25% para a fração AcO 2 e 279,31% para a fração EtOH70.

Os valores obtidos para os parâmetros da eliminação do radical livre para a fração testada FLM e o padrão estão resumidos na **Tabela 5.10**.

Tabela 5.10 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH^{*} da fração FLM e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).

Frações Padrão	EC ₅₀	Desvio	Coeficientes de correlação	Intervalos de tempo no estado de equilíbrio		T _{EC50}	Classificação	AE	Classificação
				gL ⁻¹	%DPPH [*] min ⁻¹				
EtOH50	FLM	0,083 (2)	-370,78	0,999	300-420	333	Muito lenta	0,036	Baixa
EtOH70	FLM	0,028 (4)	-569,31	0,989	300-420	325	Muito lenta	0,110	Baixa
AcO	FLM	0,024 (3)	-1170,9	0,990	240-360	276	Muito lenta	0,148	Baixa
EtOH	FLM	0,013 (2)	-2615,3	0,998	300-420	350	Muito lenta	0,219	Baixa
AcO 2	FLM	0,016 (4)	-1320,1	0,994	300-420	342	Muito lenta	0,180	Baixa
Ácido Gálico		0,000882 (1)	-37521	0,981	20-75	30	Intermedia- lenta	37,80	Baixa

6. CONCLUSÕES

Os valores obtidos para os parâmetros da eliminação do radical livre para as frações testadas FL1, FL2 e FLM e o padrão estão resumidos na **Tabela 6.1**.

Tabela 6.1 - Valores dos parâmetros da eliminação DPPH* das frações e padrão, valores expressos como médias (CV), (n = 3).

Frações Padrão	EC ₅₀	Desvio	Coeficientes de correlação	Intervalos de tempo no estado de equilíbrio		T _{EC50}	Classificação	AE	Classificação
				gL ⁻¹	%DPPH*min ⁻¹				
R1	FL1	0,181 (1)	-169,15	0,979	300-400	378	Muito lenta	0,015	Baixa
	FL2	0,332 (1)	-127,51	0,993	240-480	458	Muito lenta	0,007	Baixa
EtOH50	FL1	0,174 (2)	-231,73	0,992	240-420	420	Muito lenta	0,014	Baixa
	FL2	0,178 (3)	-225,32	0,998	120-420	420	Muito lenta	0,013	Baixa
	FLM	0,083 (2)	-370,78	0,999	300-420	333	Muito lenta	0,036	Baixa
EtOH70	FL1	0,071 (1)	-548,12	0,993	360-480	452	Muito lenta	0,031	Baixa
	FL2	0,074 (3)	-488,4	0,995	240-480	458	Muito lenta	0,029	Baixa
	FLM	0,028 (4)	-569,31	0,989	300-420	325	Muito lenta	0,110	Baixa
EtOAc	FL1	0,028 (4)	-1498,5	0,995	240-480	449	Muito lenta	0,079	Baixa
	FL2	0,030 (3)	-1635,2	0,998	240-480	460	Muito lenta	0,072	Baixa
AcO	FL1	0,039 (3)	-1032,7	0,997	300-540	454	Muito lenta	0,056	Baixa
	FL2	0,041 (2)	-1030,2	0,997	240-480	457	Muito lenta	0,054	Baixa
	FLM	0,024 (3)	-1170,9	0,990	240-360	276	Muito lenta	0,148	Baixa
EtOH	FL1	0,013 (4)	-2941,7	0,988	240-480	360	Muito lenta	0,213	Baixa
	FL2	0,015 (3)	-2835,7	0,999	240-480	402	Muito lenta	0,171	Baixa
	FLM	0,013 (2)	-2615,3	0,998	300-420	350	Muito lenta	0,219	Baixa
AcO 2	FL1	0,032 (3)	-1299,1	0,999	240-540	447	Muito lenta	0,070	Baixa
	FL2	0,033 (3)	-1258,7	0,992	240-480	480	Muito lenta	0,064	Baixa
	FLM	0,016 (4)	-1320,1	0,994	300-420	342	Muito lenta	0,180	Baixa
SnAcO	FL1	0,056 (2)	-752,83	0,998	240-540	420	Muito lenta	0,043	Baixa
	FL2	0,057 (2)	-712,25	0,987	240-480	446	Muito lenta	0,039	Baixa
Ácido Gálico	0,000882 (1)	-37521	0,981	20-75	30	Intermedia- lenta	37,80	Baixa	

Os resultados do presente estudo indicam que as frações resultantes do resíduo desalcoholizado após destilação a baixa pressão do vinho tinto, apresentam um rendimento global de 15,14 gL⁻¹. Este varia consoante as frações,

destacando-se as SnAcO, AcO e R1 com 44%, 20% e 11%, respectivamente. Um segundo grupo de frações, EtOH70, EtOH50 e EtOH que oscilam entre os 8%, 7% e 5%. Finalmente as AcO 2 e EtOAc apresentam os mais baixos rendimentos, respectivamente 4% e 3%.

Aquando da análise dos açúcares totais as frações mais relevantes são EtOH70, EtOH50, AcO e AcO 2 respectivamente com 455, 397, 289 e 242 mgg⁻¹. Os principais açúcares são o UA, a Glc, a Man, a Ara e a Gal.

Os resultados relativos à quantificação dos compostos fenólicos totais, expressos em g equivalente padrão/L vinho, são muito semelhantes para ambos os padrões. Todavia as frações EtOAc e EtOH apresentam uma maior afinidade para a (+)-catequina do que para o ácido gálico, 56/44 e 108/98 mg equivalentes/L vinho. As frações SnAcO, AcO, EtOH e EtOAc são as mais representativas quanto à quantificação dos compostos fenólicos totais.

A atividade de eliminação de radicais livres dos compostos fenólicos das frações foi avaliada pelo método DPPH[•]. As diferentes frações demonstraram um comportamento diferente no sentido do radical livre DPPH[•] em termos de atividade antioxidante. Os valores EC₅₀ diferem entre as frações, enquanto que os T_{EC50} não diferem muito (cinéticas muito lentas) e, neste sentido, a AE parece ser um parâmetro mais adequado para melhor definir um composto como bom antioxidante.

O resultado do presente estudo indica que as frações apresentam uma AE muito inferior ao padrão, ácido gálico.

As frações perdem AE à medida que o tempo avança (FL1 versus FL2), enquanto que as frações preservadas por microencapsulamento (FLM) têm AE muito superiores (FL1 versus FLM).

As fracções FL2 diminuem a sua atividade antioxidante comparadas com as frações FL1 e FLM. As FLM têm mais capacidade para a eliminação dos radicais livres do que as FL1 (maior AE).

O resultado do presente estudo indica que as frações, preservadas por microencapsulamento (FLM), podem ser usadas como fonte de antioxidantes naturais de fácil acessibilidade, prolongando o seu tempo de prateleira. Por outro lado, será extremamente vantajoso utilizar os resíduos do processo da destilação

vínica como antioxidantes naturais em alternativa aos antioxidantes sintéticos usados na indústria alimentar para prolongar o tempo de prateleira dos alimentos.

São conhecidos inúmeros benefícios associados aos compostos bioactivos do vinho. A família de compostos à qual são atribuídos a maioria dos benefícios associados ao vinho é a dos compostos fenólicos com potencial aplicação como antioxidantes alimentares e preventivos de algumas doenças. Como alternativa ao consumo de vinho para obtenção destes benefícios, surge a proposta de consumo de um alimento funcional, a produzir a partir do resíduo da destilação vínica.

Trabalho futuro

Como o vinho é uma mistura complexa de compostos fenólicos, a atividade antioxidante das frações estudadas a partir do resíduo desalcoolizado após destilação não é uma propriedade de um simples composto fenólico. É importante determinar qual o grupo dos compostos fenólicos é mais significativa na determinação da atividade antioxidante das frações.

A tecnologia do microencapsulamento poderá também ser utilizada com o objetivo de preservar e libertar os compostos em taxas controladas em diferentes condições fisiológicas do aparelho digestivo. Assim, estas microcápsulas podem ser adicionadas durante o processo de produção industrial de um alimento com vista ao seu enriquecimento e/ou fortificação nestes componentes.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, M. J.; Isaacs, M.; Matsuhiro, B.; Mendoza, L.; Zúñiga, E. A. (2009) Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine. *Carbohydrate Research*, **344**, 1095–1101.
- Alonso, A. M.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G.; Puertas, B.; and Garcia, A. (2002) Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 5832–5836.
- Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S. and Robards, K. (2001) Methods for testing antioxidant activity: Critical Review. *Analyst*, **127**, 183-198.
- Arnous, A.; Markis, D. P.; Kefals, P. (2002) Correlation of pigment of flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, **15**, 655–665.
- Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A.; Aiba, S. (1998) Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. *Carbohydrate Polymers*, **36**, 105-119.
- Ascheri, D. P. R. (1997) Seleção de material de parede para microencapsulação de óleo essencial e laranja através da secagem por atomização. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- Auger, C., Al-Awwadi, N., Bornet, A., Rouanet, J. M., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P. L. (2004) Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Research International*, **37**, 233-245.
- Bakan, J. A. (1973) Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology*, **27**, 34-44.

- Baranowski, J. D.; Nagel, C. W. (1981) Isolation and identification of the hydroxycinnamic acid derivatives in white riesling wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **32**, 5-13.
- Barczaka, A. M. B.; Kolodziejczyk, P. P. (2011) Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*, **34** 1301-1309.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2004) *Food Chemistry*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bell, A. E. (1989) *Gel structure and food biopolymers*, T. M. Hardaman (Ed.), *Water and food quality*, Essex, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 251-276.
- Berrocal, M. C.; Aberger, A. (1999) Shelf life of saturated vitamin E carrier system for use in the food industry. *Food Science and Technology International*, **5**, 509-513.
- Boulet, J. C.; Williams, P.; Doco, T. (2007) A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 79-85.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**, 317-333.
- Budavari, S. (1996) *The Merck Index: An Encyclopaedia of Chemical, Drugs and Biologicals*, 12th ed., Merck Research Laboratories, NJ.
- Cabrita M. J.; Silva, R. J.; Laureano, O. (1999) Os compostos fenólicos das uvas e dos vinhos. *I Seminário Internacional de Viticultura*, 61-101.
- Cadenas, E.; Packer, L. (1996) *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York.

- Cardello, H. M. A. B.; Celestino, E. M. (1996) Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes de encapsulantes. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **30**, 166-177.
- Coelho, E., Rocha, S. M., and Coimbra, M. A. (2011) Foamability and Foam Stability of Molecular Reconstituted Model Sparkling Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 8770–8778.
- Coimbra, M. A. (1993) Isolamento e caracterização dos polissacarídeos das paredes celulares da azeitona. *Tese de Doutorado*, Universidade de Aveiro, Portugal.
- Coimbra, M. A.; Gonçalves, F.; Barros A. S.; Delgadillo, I. (2002) Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Analysis of White Wine Polysaccharide Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3405-3411.
- Dell`Agli, M.; Buscialà, A.; Bosisio, E. (2004) Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, **63**, 593-602.
- Dreosti, I.E. (2000) Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*, **16**, 692-694.
- Dziezak, J. D. (1988) Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, **42**, 136-151.
- Fanger, G. O. (1974) *Microencapsulation*, Plenum Press, New York.
- Flórez, S. M.; Gallego, J. G.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, **17**, 271-278.
- Figueirêdo, R. M. F. (1998) Caracterização físico-química do suco e pó de acerola (*Malpighia puniceifolia*, L.). *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

- Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L.; Teissedre, L. P. (1995) Principal phenolic phytochemicals in select California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 890-894.
- Gass, T. (2001) *Petition for amending the National List of the USDA's National Organic Program*, USDA/AMS/TM/NOP, Washington.
- Gaulejac, N. S. P.; Glories, Y.; Vivas, N. (1999) Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 425-431.
- Gennadios, A.; Mchugh, T. H.; Weller, C. L.; Krochta, J. M. (2002) *Edibles coatings and films based on proteins*, In: Krochta J. M., Baldwin E. A., Nisperos-Carriedo M. O. (Ed.): *Edible Coatings and Films to improve Food Quality*, CRC PRESS LLC, 201-277.
- Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; Scaccini, C. (1998) Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 361-367.
- Ghosh; S. K. (2006) *Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation*, Wiley-VCH, London.
- Gouin, S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 330-347.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease: Review. *Biochemical Journal*, **219**, 1-14.
- Hensel, A.; Meier, K. (1999) Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. *Planta Medica*, **65**, 395-399.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. & Venema, D. P. (1992) Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids

- in vegetables and fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1591-1598.
- Ho, C-T; Lee, C. H.; Huang, M-T. (1992) *Phenolic compounds in food and their effects on health*, American Chemical Society, Washington.
- Jackson, R. (1994) Chemical Constituents of grapes. *WINE science: principles and applications*, London: Academic Press, 178-219.
- Jackson, S. J.; Lee, K. (1991) Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **24**, 289-297.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Douglas-Kinhorn, A.; Metha, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **257**, 218-220.
- Kanner, L.; Frankel, E.; Granit, R.; German, B.; Kinsella, J. E. (1994) Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 64-69.
- Katalinić, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity total phenols. *Food Chemistry*, **94**, 550-557.
- Katalinić, V.; Milos, M.; Modun, D.; Musić, I.; Boban, M. (2004) Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, **86**, 593-600.
- Keenan, T. R. (1994) *Gelatin*, J. Kroschwitz (ed.) Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, New York: Wiley, 12, 406-416.
- Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. W. (2001) A Cyclic Voltammetry Method for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1957-1965.

- King, W.; Trubiano & P.; Perry, P. (1976) Modified starch encapsulating agents offer superior emulsification, film forming and low surface oil. *Food Product Development*, **December**, 54-57.
- Košmerl, T.; Cigić, B. (2008) Antioxidant potential and phenolic composition of white and red wines. In *Second international Junior Researchers Meeting «From Grape to Wine»*, Athenes: IRL Press.
- Kova, V.; Bourzeix, M.; Heredia, N.; Ramos, T. (1995) Études des catéchines et proanthocyanidols de raisins et vins blancs. *Revue Française d'Oenologie*, **125**, 7-15.
- Landrault, N.; Larronde, F.; Delaunay, J. C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J.; Mérillon, J.; Gasc, F., Cros, G.; Teissedre, P. L. (2002) Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2046-2052.
- Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G. (2001) Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 328–332.
- Laurrari, J. A.; Moreno, C. S.; Rupérez, P.; and Calixto, F. S. (1999) Free Radical Scavenging Capacity in the Aging of Select Red Spanish Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1603-1606.
- Louli, V.; Ragoussis, N.; Magoulas, K. (2004) Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, **92**, 201-208.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. (1999) The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chemistry*, **65**, 1-8.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. (1999) The polyphenol of grape pomace: Rapid communication. *Food Chemistry*, **65**, 1-8.

- Macheix, J. J.; Sapis, J. C.; Fleuriet, A. (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30**, 441-486.
- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (1996) *Food Antioxidants – Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, Marcel Dekker Inc., New York.
- McCormick, R. (1987) Exploiting the Novel Properties of Pectin and Gelatin Gels. *Prepared Foods*, **5**, 204-205.
- McDougall, G. J.; Morrison, I. M.; Stewart, D.; Hillman, J. R. (1996) Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *Journal Science Food Agriculture*, **70**, 131-150.
- McWilliams, M. (2001) *Foods - Experimental Perspectives*, 4th ed., Englewood Cliffs, Prentice Hall, NJ.
- Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000) Measurements of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 577-599.
- Minussi, R. C.; Rossi, M.; Bolobna, L.; Corbi, L.; Rotilio, D.; Pastore, G. M.; Durán, N. (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potencial of commercial wines. *Food Chemistry*, **82**, 409-416.
- Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **26**, 211-219.
- Monagas, M.; Cordovés, C. G.; Bartolomé, B. (2006) Evolution of phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, **95**, 405-412.

- Moreno, C. S. (2002) Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems: Review. *Food Science and Technology International*, **8**, 121-137.
- Moreno, C. S.; Larrauri, J. A.; and Calixto, F. S. (1999) Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **79**, 1301–1304.
- Moreno, C. S.; Larrauri, J. A.; and Calixto, F. S. (1998) A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal Science Food Agriculture*, **76**, 270-276.
- Mudnic, I.; Modun, D.; Rastija, V.; Vukovic, J.; Brizic, I.; Katalinic, V.; Kozina, B.; Saric, M. M.; Boban, M. (2010) Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chemistry*, **119**, 1205-1210.
- Naczka, M.; Shahidi, F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 95-111.
- Ordoudi, S. A.; Tsimidou, M. Z.; Anastasios, P. V.; and Bakalbassis, E. G. (2006) Structure-DPPH[•] Scavenging Activity Relationships: Parallel Study of Catechol and Guaiacol Acid Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5763-5768.
- Pachón, M. S. F.; Villaño, D.; Parrilla, M. C. G.; Troncoso, A. M. (2004) Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, **513**, 113-118.
- Papas, M. A. (1999) *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, CRC PRESS, New York.
- Pavlenko, N. (2000) Propriétés curatives du raisin et du vin: additifs alimentaires et préparations médicinales à base de ces additifs. *XXVème Congrès Mondial de la Vigne et du Vin*, **4**, 17-22.

- Penna, N. G.; Daudt, C. E.; Henriques, J. A. P. (2001) Comportamento de ésteres hidrocínâmicos durante a vinificação de vinhos brancos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **36**, 983-989.
- Piljac, J.; Martiney, S.; Valek, L.; Stipcevic, T.; Ganic, K. K. (2005) A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. *Food Technology and Biotechnology*, **43 (3)**, 271–276.
- Pietta, G. P. (2000) Flavonoids as antioxidants: reviews. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042.
- Poppe, J. (1997) *Gelatin*, 2nd ed., A. Imeson (ed.), London: Blackie Academic and Professional, *Thickening and Gelling Agents for Food*, 144-168.
- Quirós, A. R. B.; Yusty, M.A. L.; Hernández, J. L. (2009) HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*, **42**, 1018-1022.
- Radovanović, A.; Radovanović, B.; Jovančićević, B. (2009) Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*, **117**, 326–331.
- Rastija, V.; Šarić, M. M. (2009) QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 400-408.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Durbourdieu, D. (2000) *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Rice-Evans, C; Miller, N. J.; Bolwell, G. P.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **22**, 375-383.

- Rice-Evans, C.; Nicolas, J.; Miller, J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, p.933-956.
- Risch, S. J. (1998) Encapsulation: *Overview of Uses and Techniques*. In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients (ACS Symposium Series 590), Risch, S. J. & Reineccius, G. A. (Ed), American Chemical Society, Washington, 2-7.
- Robards, K. & Antolovich, M. (1997) Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. *Analyst*, **122**,11R-34R.
- Roussis, I. G.; Lambropoulos, I.; Soulti, K. (2005) Scavenging capacities of some wines and wine phenolic extracts. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, 351-358.
- Ruiz, F. A.; Falcón, M. S. G.; Lamela, M. C. P.; Carballo, E. M.; Gándara, J. S. (2009) Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chemistry*, **113**, 53-60.
- Sato, M.; Ramarathnam, N.; Suzuki, Y.; Ohkubo, T.; Takeuchi, M., Ochi, H. (1996) Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 37-41.
- Shahidi, F.; Han, X. (1993) Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**, 501-547.
- Sheu, T. Y.; Rosenberg, M. (1995) Microencapsulation by Spray Drying Ethyl Caprylate in Whey Protein and Carbohydrate Wall Systems. *Journal of Food Science*, **60**, 98-113.
- Sikorski, Z. E., Kolakowska, A. (2003) *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*, Chapter 8: *Lipid Oxidation in Food Systems*, CRC Press.

- Singleton, V. L. (1987) Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38**, 69-77.
- Singleton, V. L. (2000) A survey of wine aging reactions, especially with oxygen. In Proceedings of the ASEV 50th Anniversary Annual Meeting. American Society for Enology and Viticulture, Davis, California.
- Slade, L.; Levine, H. (1987) Polymer-chemical properties of gelatin in foods. In: Pearson, A. M., Dutson, T. R., Bailey, A. J. (Eds): Advances in meat research, Collagen as food, New York: Van Nostrand Reinhold Company, 4, 251-266.
- Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. D.; Roques, M. A. (2001) Mechanical water vapour barrier and thermal properties of gelatine based edible films. *Food Hydrocolloids*, **15**, 423-432.
- Soleas, G. J.; Grassie, L.; Josephy, P. D.; Golberg, D. M.; Diamandis, E. P. (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, **35**, 119-124.
- Strack, D. (1997) *Phenolic Metabolism*. Plant Biochemistry, Academic Press, San Diego, California, pp 387-416.
- Stratil, P.; Kuban, V.; Fojtova, J. (2008) Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences*, **26 (4)**, 242-253.
- Sun, B.; Spranger, M. I. (2005) Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes: review. *Ciência Técnica Vitivinícola*, **20**, 59-89.
- Tahiri, M.; Pellerin P.; Tressol, J. C.; Doco, T.; Pépin, D.; Yves Rayssiguier, Y.; Coudray, C. (2000) The Rhamnogalacturonan-II Dimer Decreases Intestinal

- Absorption and Tissue Accumulation of Lead in Rats. *The Journal of Nutrition*, **130**,249-253.
- Tarko, T.; Duda-Chodan, A.; Sraka, P.; Satora, P.; Jurasz, E. (2008) Physicochemical and antioxidant properties of selected polish grape and fruit wines. *Acta Alimentaria Polonica-Technology Alimentaria*, **7 (3)**, 34-45.
- US FDA (1997) *Gelatin processing*. FDA/Center of Biologics Evaluation and Research-Transmissible Spongiform Encephalopathies. Advisory Committees. Transcript of Meeting April 23, NOSB TAP Review by Organic Materials Review Institute for the USDA National Organic Program, Washington.
- Vaquero, M. J. R.; Alberto, M. R.; Nadra, M. C. M. (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, **18**, 93-101.
- Villaño, D.; Pachón, M. S. F.; Troncoso, A. M.; Parrilla, M. C. G. (2005) Comparasion of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, **538**, 391-398.
- Villaño, D.; Pachón, M. S. F.; Moyá, M. L.; Troncoso, A. M.; Parrilla, M. C. G. (2007) Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, **71**, 230-235.
- Virgili, M.; Contestabile, A. (2000) Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats. *Neuroscience Letters*, **281**, 123-126.
- Vitaglione, P.; Fogliano, V. (2004) Use of antioxidants to minimize the human heath risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food: Review. *Journal of Chromatography B*, **802**, 189-199.

Williams, W. B.; Cuvelier, M. E.; and Berset, C. (1995) Use a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **28**, 25-30.

Yang, J.; Martinson, T. E.; Liu, R. H. (2009) Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, **116**, 332-339.

Yilmaz, Y.; Toledo, R. T. (2004). *Trends in Food Science & Technology*, **15**, 422-433.

<http://ec.europa.eu/eurostat>, 2012, 12 de Abril.

<http://ec.europa.eu/eurostat>, 2007, 12 de Dezembro.

